

MESTRADO EM CIÊNCIAS FORENSES

2009/2011

Ana Isabel Tavares

Depressão em doentes com lúpus: o papel
da variabilidade genética do sistema
monoaminérgico



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Dezembro, 2011

Depressão em doentes com lúpus: o papel da variabilidade genética do sistema monoaminérgico

Ana Isabel Tavares

Dissertação do Ciclo de estudos conducente ao grau de mestre em Ciências Forenses da
Universidade do Porto

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEZEMBRO, 2011



Os orientadores,

Prof^a. Doutora Berta Martins da Silva

(Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto
Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto)

Prof. Doutor Carlos Vasconcelos

(Unidade de Imunologia Clínica, Centro Hospitalar do Porto,
Hospital Santo António)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o contributo de várias pessoas que directa ou indirectamente possibilitaram o seu desenvolvimento, e às quais não posso deixar de prestar o meu agradecimento.

À Comissão Coordenadora do Mestrado em Ciências Forenses, em especial à Professora Doutora Teresa Magalhães, pela oportunidade em frequentar este ciclo de estudos.

À Professora Doutora Berta Martins, por toda a ajuda prestada ao longo da realização deste trabalho. Pela apoio e incentivo, fazendo-me acreditar de que era capaz. Por toda a paciência, compreensão e tolerância nos momentos mais difíceis. Com a Professora tive oportunidade não só de enriquecer os meus conhecimentos como também crescer enquanto pessoa.

Ao Professor Doutor Carlos Vasconcelos, por todos os conhecimentos transmitidos na área das Doenças Autoimunes. Apesar de muito atarefado, agradeço para além da sua simpatia e incentivo, as correcções e sugestões científicas.

À Professora Dra. Sara Cavaco, pela atenção, ajuda e esclarecimentos fornecidos na área da Psicologia Clínica.

Ao Professor Doutor Paulo Pinho e Costa pela disponibilidade, ajuda e esclarecimentos fornecidos. Pelas correcções e sugestões científicas.

Ao Doutor Constantin Fesel e Doutora Sandra Godinho, do Instituto Gulbenkian de Ciência, pela ajuda e apoio prestados durante a execução da prática do trabalho.

À Mestre Andreia Bettencourt, à Mestre Cláudia Carvalho e à Mestre Bárbara Leal, agradeço toda a ajuda prática, ensinamentos e sugestões científicas. Obrigado pela vosso apoio, disponibilidade e paciência em todos os momentos. Obrigado por aturarem o meu ‘mau humor’ nestes últimos tempos.

À Mestre Oriana Marques, pela amizade, simpatia, apoio e toda a paciência. Agradeço também o abrigo em terras Lisboetas.

Agradeço à Mestre Sandra Maia, Dra. Dina Lopes, D. Encarnação e Dra. Sara Fonseca pela doçura, simpatia, boa disposição e incentivos. Obrigado pela ‘mão’ nos momentos mais difíceis e pelo ‘sorriso’ e compreensão nas alturas mais tristes.

A os amigos que estiveram sempre presentes, até mesmo nos momentos menos bons, um obrigado e um grande beijinho pela força, incentivo, apoio e compreensão.

Aos meus amigos “Faróis”, valorizo toda a compreensão mas, fundamentalmente, a constante lembrança de que o nosso percurso pela vida faz muito mais sentido quando olhamos em redor e damos um bocadinho de nós ao próximo.

Às amigas de equipa e alunas, tenho a agradecer todos os bons momentos de diversão, descontração, criação e trabalho duro. Foi muitas vezes na água que encontrei o meu refúgio e o discernimento para ultrapassar algumas barreiras.

Aos meus cunhadinhos, não posso deixar de agradecer toda a preocupação e ajuda. Todo o incentivo, compreensão e amizade.

Aos meus irmãos, agradeço todos os conselhos de quem já passou por aqui mas, fundamentalmente, pelo simples facto de estarem presentes. Obrigado por todo o vosso apoio e incentivo, e por serem um alicerce de força. Obrigado por tudo!

Aos meus pais, o meu abrigo seguro, apesar de ser muito pouco face a tudo o que fizeram por mim, agradeço com um beijinho do tamanho do Mundo. Não só pela constante preocupação, carinho, ajuda e confiança, mas também por todos os sacrifícios, incentivos e motivações. Obrigado por cada novo ensinamento que faz de mim uma pessoa melhor e por cada simples sorriso que por vezes representa tanto! Obrigado por nunca me deixarem desistir. Sem vocês e sem a vossa força, este percurso não teria sido possível.

Por último, não posso deixar de agradecer a Deus, pelo dom da vida.

Muito obrigado!

Parte dos resultados observados foram apresentados em formato de poster num Congresso Internacional:

Bettencourt A., Silva A.M., **Tavares A.**, Carvalho C., Leal B., Santos E., Gonçalves A., Moreira I., Vasconcelos C., Costa P.P., Cavaco S., Silva B.M. No association between ApoE polymorphisms and neurolupus in Portuguese patients – 8th European Lupus Meeting, Porto, 6 a 9 Abril 2011;
Lupus, Vol. 20 (4) 254-481, 2011 (resumo publicado)

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença inflamatória, crónica, multissistémica, com uma sintomatologia complexa, podendo envolver vários órgãos, até mesmo o Sistema Nervoso Central (SNC). A depressão tem sido apontada como um dos sintomas neuropsiquiátricos mais comum em doentes com LES. A etiologia precisa da depressão está longe de ser conhecida mas sabe-se que resulta da expressão de um conjunto de factores biológicos, psicológicos e sócio-culturais. No âmbito dos factores biológicos, o défice de neurotransmissores como a serotonina, dopamina e noradrenalina, tem sido um dos aspectos mais estudados, com implicação no desenvolvimento da depressão. O decréscimo destas aminas em doentes deprimidos, pode estar na origem de um conjunto de alterações ao nível da síntese, transporte, metabolismo e acção destes neurotransmissores. Vários estudos têm identificado alguns SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em genes implicados na sinalização monoaminérgica, que aumentam o risco para a depressão.

A apolipoproteína E é uma glicoproteína determinante no transporte e metabolismo de lípidos, desempenhando uma importante função ao nível do SNC, nomeadamente nos processos de desenvolvimento, regeneração e protecção neuronal. O gene da apoE é caracterizado por 3 alelos distintos (e2, e3 e e4) que dão origem a 3 isoformas diferentes de proteína. Nos últimos anos, vários estudos têm evidenciado a relação do alelo e4 com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de algumas patologias que afectam o cérebro, nomeadamente a Doença de Alzheimer.

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar o papel da variabilidade genética do sistema monoaminérgico na depressão e no atingimento do SNC em doentes com LES. Foram estudados 5 SNPs de genes do sistema serotoninérgico nomeadamente, HTR1A, HTR2A, TPH1 e TPH2 e 1 SNP do gene COMT, do sistema dopaminérgico. Paralelamente, foram também estudados os polimorfismos da ApoE, na coorte de doentes.

Este estudo incidiu sobre uma população controlo de 187 indivíduos saudáveis e 355 doentes com LES, diagnosticados de acordo com os critérios do ACR, provenientes das regiões Norte e Sul do país. Da população de doentes com LES recrutados da consulta da Unidade de Imunologia Clínica do Hospital Santo António, 67 foram encaminhados para a consulta de Neurologia para avaliação Neuropsicológica. A esta população foi aplicada a escala de HADS, para rastreio da depressão e ansiedade e o MMSE, para avaliação das competências cognitivas básicas. Uma vez caracterizada, esta coorte de doentes foi dividida em grupos: doentes LES com depressão ($HADS \geq 8$, $n=30$) e sem depressão ($HADS < 8$, $n=37$), e doentes Neurolupus ($n=30$) e doentes não Neurolupus ($n=37$). O diagnóstico Neurolupus foi estabelecido de acordo com os critérios ACR e através da experiência clínica. A genotipagem dos polimorfismos dos genes do sistema monoaminérgico foi feita por Espectrometria de Massa (MassARRAY iPLEX - Sequenom) para a população

total de doentes LES e população controlo. A apolipoproteína E foi genotipada apenas para os doentes Lúpus com avaliação neuropsicológica, através da técnica de PCR-RFLP.

Os polimorfismos estudados nos genes do sistema monoaminérgico, não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes quando comparadas as frequências alélicas e genotípicas entre doentes com LES, com e sem depressão e doentes Neurolupus e Não Neurolupus. O alelo G do polimorfismo rs1386494, presente no gene TPH2 foi, tal como descrito em estudos prévios, mais frequente nos casos de depressão (0.85 vs 0.72, $p=0.051$). Relativamente ao gene HTR1A, o aumento da frequência do alelo G na população LES com depressão vs população de doentes sem depressão (0.50 vs 0.42, $p=0.349$), corrobora algumas observações reportadas por outros grupos de trabalho. Quando a análise das frequências alélicas dos vários polimorfismos em estudo é alargada à população total de doentes com LES, observa-se associação entre o polimorfismo rs6311, localizado no gene HTR2A, e o LES. A frequência do alelo A é significativamente superior nesta coorte de doentes, quando comparados com a população controlo (50% vs 41%, $p=0.012$, OR=1.38 (IC: 1.07-1.78)).

No que respeita à apolipoproteína E, a frequência do alelo e4 é semelhante entre doentes com LES deprimidos e não deprimidos e doentes Neurolupus e não Neurolupus (13.0% vs 12.1%).

Dos polimorfismos estudados, nenhum foi associado a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de depressão ou Neurolupus. Contrariamente ao sugerido em estudos prévios, os resultados obtidos não suportam a associação entre a ApoE e o Neurolupus. O aumento do tamanho da amostra pode permitir retirar conclusões mais precisas.

Este é o primeiro estudo que reporta associação entre o gene HTR2A e o desenvolvimento do LES. Perante os resultados obtidos neste trabalho, surge uma questão: “Será que existe algum paralelismo entre os mecanismos da depressão e os mecanismos associados ao desenvolvimento do Lúpus?” Embora esta questão permaneça em aberto, o crescente reconhecimento da serotonina como amina imunomoduladora, poderá ser um ponto de partida para investigações futuras nesta área.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory, chronic, multisystemic disease with a complex symptomatology that may involve different organs, including the Central Nervous System (CNS). Depression is one of the most common neuropsychiatric symptoms in SLE. Although aetiology of is far from being identified, it is known to be an expression of biological, psychological and socio-cultural factors. Neurotransmitters, with implications in the development of depression, such as serotonin, dopamine and norepinephrine, have been intensively studied. The decrease of these amines in depressed patients may result from changes in the synthesis, transport, metabolism and action of these neurotransmitters. Several studies have identified some SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), in genes that are involved in monoaminergic signalling, that increase the risk for depression.

Apolipoprotein E is a glycoprotein with a major role in transport and metabolism of lipids. It plays an important function in CNS, particularly in development, regeneration and neuronal protection processes. The apoE gene has three common alleles (e2, e3 and e4) characterized by three different protein isoforms. Several studies have shown the relation between e4 allele and some brain diseases, including Alzheimer's disease.

The main goal of this study was to evaluate the role of genetic variability of the monoaminergic system in depression and in CNS involvement in SLE patients. We studied 5 SNPs of genes in the serotonin system in particular, HTR1A, HTR2A, TPH1 and TPH2, and one SNP of the COMT gene (dopaminergic system). In parallel, we also studied the polymorphisms of ApoE in the patient's cohort.

This study included 187 healthy subjects and 355 SLE patients from the North and the South of Portugal. Sixty seven SLE patients recruited from the Clinical Immunology Unit outpatient clinic in Hospital Santo António, were referred for neuropsychological evaluation in the Neurology Department. Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) was used as a *screening* for anxiety and depression and Mini-Mental State Examination (MMSE) was used to assess basic cognitive skills. Once characterized, this cohort of patients was divided into groups: SLE patients with depression ($HADS \geq 8$, $n=30$) and without depression ($HADS < 8$, $n=37$), and Neurolupus ($n=30$) and non Neurolupus patients ($n=37$). Patients were diagnosed with Neurolupus, according to the ACR criteria and based on clinician experience.

Genotyping of polymorphisms in monoaminergic system genes was performed by Mass Spectrometry (MassARRAY iPLEX – Sequenom), for the total SLE patients and controls. ApoE genotyping was assessed by PCR-RFLP only for SLE patients with neuropsychological evaluation.

None of the studied polymorphisms showed statistical significance when comparing the allelic and genotype frequencies between SLE patients with and without depression and Neurolupus and non Neurolupus. The G allele frequency of rs1386494 polymorphism (TPH2) was higher in SLE patients with

depression (0.85 vs 0.72, $p=0.051$). For the HTR1A gene, increased frequency of the G allele in depression cases (0.50 vs 0.42, $p=0.349$), confirms previous observations reported by other groups.

When the analysis of allele frequencies is extended to all SLE patients, an association was observed between the polymorphism rs6311, located in HTR2A gene, and LES. The frequency of the A allele is significantly higher in this cohort of patients when compared with the control population (50% vs 41%, $p=0.012$, OR=1.38, 1.07-1.78).

The frequency of the apoE e4 allele was similar in SLE patients with and without depression and Neurolupus and non neurolupus (13.0% vs 12.1%).

Among the studied polymorphisms, none was associated with increased susceptibility for developing depression or even Neurolupus. These results do not support an association between ApoE polymorphism and Neurolupus in this cohort of patients, as previously reported. It is necessary to increase the sample size in order to draw conclusions.

This is the first study that reports an association between the serotonin receptor 2A (HTR2A) gene and the development of SLE. After this study, one question arises: "Is there any linkage between depression mechanisms and the mechanism associated with development of SLE?" Although it remains an open question, the evident recognition of serotonin as immunomodulatory amine, may be a starting point for future research in this area.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
 I. INTRODUÇÃO.....	 2
1.1 Depressão.....	2
1.1.1 Factores de risco.....	3
1.1.2 Sintomas e diagnóstico.....	3
1.1.3 Etiologia.....	4
1.1.4 Patofisiologia.....	5
1.1.4.1 Hipótese monoaminas.....	6
1.1.4.2 Hipótese dos receptores de neurotransmissores.....	8
1.1.4.3 Hipótese neurotrofinas.....	8
1.1.4.4 Sistema hipotálamo - hipófise - adrenal.....	8
1.1.4.5 Hipótese citocinas.....	9
1.1.4.6 Via óxido nítrico.....	10
1.1.4.7 Stress oxidativo.....	10
1.2 Depressão e doenças crónicas.....	10
1.3 Depressão e factores genéticos.....	11
1.3.1 Sistema serotoninérgico: os genes candidatos.....	11
1.3.2 COMT.....	17
1.3.3 Apolipoproteína E.....	17
1.4 Lúpus Eritematoso Sistémico.....	19
1.4.1 Etiologia.....	20
1.4.1.1 Susceptibilidade genética.....	21
1.4.1.2 Influência hormonal.....	22
1.4.1.3 Factores ambientais.....	22
1.4.2 Fisiopatologia.....	23
1.4.3 Envolvimento do Sistema Nervoso Central.....	23
1.4.4 Depressão em doentes com LES.....	24
 II. OBJECTIVOS.....	 27

III. MATERIAL e MÉTODOS	29
3.1 População em estudo	29
3.1.1 Caracterização clínica	29
3.2 Amostras biológicas	30
3.3 Estudos genéticos.....	30
3.3.1 Estudos de associação	30
3.3.2 Single Nucleotide Polymorphisms -SNP	30
3.3.3 Selecção de genes candidatos e determinação dos SNPs.....	30
3.3.4 Extracção de DNA: método ' <i>salting out</i> '	31
3.3.5 Genotipagem MassARRAY iPLEX - Sequenom	32
3.3.5.1 Desenho dos primers e compatibilidade de SNPs	33
3.3.5.2 Isolamento e quantificação do DNA	34
3.3.5.3 Amplificação do DNA para genotipagem	34
a) Reacção em Cadeia da Polimerase: PCR.....	34
3.3.5.4 Remoção dos sNTPs não incorporados	35
a) Reacção SAP	35
3.3.5.5 Reacção iPLEX.....	35
3.3.5.6 SpectroCHIP Array.....	36
3.3.5.7 Análise dos dados.....	36
3.3.6 Genotipagem ApoE	37
3.3.6.1 PCR-RFLP.....	37
3.3.6.2 Gel poliacrilamida 8%	38
3.4 Análise estatística.....	40
IV. RESULTADOS	42
4.1 Características dos doentes em estudo com avaliação neuropsicológica	42
4.2 Polimorfismos nos genes HTR1A, HTR2A, TPH1, TPH2 e COMT	42
4.2.1 HADS	43
4.2.2 Neurolupus	43
4.2.3 LES	44
4.3 Apolipoproteína E.....	45
V. DISCUSSÃO	47
5.1 Depressão e Neurolupus.....	47
5.2 Estará o gene HTR2A implicado na susceptibilidade para o desenvolvimento do LES?	49
VI. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS	51
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hipóteses explicativas para a patogénese da depressão	5
Figura 2. Hipótese das monoaminas.....	6
Figura 3. Localização e distribuição cerebral dos neurotransmissores.....	7
Figura 4. Sinalização serotoninérgica	12
Figura 5. Modelo Funcional do polimorfismo C(-1019G) no gene HTR1A.....	15
Figura 6. Funções neuronais influenciadas pela ApoE	18
Figura 7. Isoformas proteicas da ApoE	18
Figura 8. Principais manifestações clínicas do LES.....	19
Figura 9. Factores com influência no desenvolvimento de LES	21
Figura 10. Representação esquemática de uma reacção iPLEX.....	33
Figura 11. Output do Sequenom Typer Analyzer.....	37
Figura 12. Genótipos da ApoE obtidos por PCR-RFLP com utilização da enzima Hin6I	40
Figura 13. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs6311, do gene HTR2A, na população total de doentes e população controlo	45

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da população com avaliação neuropsicológica	42
Tabela 2. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, na população de doentes LES com depressão ($HADS \geq 8$) e sem depressão ($HADS < 8$)	43
Tabela 3. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, na população de doentes Neurolupus e não Neurolupus	44
Tabela 4. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, na população total de doentes com LES e na população controlo	44
Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da apoE nos doentes LES com e sem depressão e nos doentes Neurolupus e não neurolupus	45

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial de Saúde	NL	Neurolupus
LES	Lupus Eritematoso Sistémico	GWA	<i>Genome wide association</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>	DL	Desequilíbrio de ligação
HADS	<i>Hospital Anxiety and Depression Scale</i>	DNA	Ácido desoxirribonucleico
MMSE	<i>Mini Mental State Examination</i>	VNTR	<i>Variable number tandem repeats</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
GABA	Ácido γ-aminobutírico	PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado cérebro	ddNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
SNC	Sistema Nervoso Central	RCLB	Tampão de lise de eritrócitos
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina	EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica	SDS	Dodecil sulfato de sódio
GRs	Receptores glicocorticóides	TEMED	Tetrametiletilenodiamina
PCR	Proteína C reactiva	TBE	Tris borate EDTA
ROS	Espécies reactivas de oxigénio	SAP	<i>Shrimp alkaline fosfatase</i>
NO	Óxido nítrico	SPSS	Statistical Package for Social Sciences
5-HTT	Gene transportador da Serotonina	vs	Versus
TPH	Triptofano hidroxilase	OR	<i>Odss ratio</i>
MAOA	Monoamina oxidase A	p	Significância estatística
HTR1A	Receptor da serotonina 1A	ns	Não significativo
HTR1B	Receptor da serotonina 1B	≥	Maior ou igual
HTR2A	Receptor da serotonina 1A	°C	Graus Celsius
HTR3A	Receptor da serotonina 3A	rpm	Rotações por minuto
COMT	Catecol-o-metiltransferase	M	Molar
ApoE	Apolipoproteína E	mM	Milimolar
CYS	Cisteína	nM	Nanomolar
ARG	Arginina	μL	Microlitro
APC	Células apresentadoras de antígenos	mL	Mililitro
NK	Células natural <i>killer</i>	ng	Nanograma
IL	Citocina	MALDI-	<i>Matrix-assited laser</i>
TNF	<i>Tumor necrose factor</i>	TOF	<i>desorption/ionization – time of flight</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition</i>		
SSRIs	Inibidores selectivos do transportador de serotonina		

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um dos distúrbios psiquiátricos mais comum na sociedade moderna e constitui actualmente um dos maiores problemas de saúde pública. Apresenta uma prevalência de 2-3% nos homens e de 5-9% nas mulheres (American Psychiatric Association).

Os transtornos depressivos são comuns, graves e, em alguns casos, podem ser uma ameaça à vida. Causam sofrimento, incapacidade e desordem social, levando frequentemente à alteração das actividades de vida diária dos pacientes e familiares próximos. É ainda a principal causa mundial de incapacidade em indivíduos entre 15 e 44 anos

Vários estudos têm vindo a demonstrar que a prevalência da depressão está a aumentar consideravelmente desde o início do século XX (Holmes 2001; Nardi 2006).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, cerca de 450 milhões de pessoas sofrem actualmente com algum tipo de transtorno mental em todo o mundo. Dessas, 121 milhões são afectadas pela depressão, o que equivale a algo próximo de 20% da população mundial total (WHO).

Para além dos valores mencionados a OMS prevê ainda que o distúrbio depressivo constitua a segunda causa de incapacidade funcional no ano de 2020 e passe mesmo para o primeiro lugar, em 2030 (World Federation of Mental Health Biennial Congress. Athens, 2009).

Em Portugal, de acordo com o Ministério da Saúde, afecta cerca de 20% da população e, actualmente, é a principal causa de incapacidade e a segunda causa de perda de anos de vida saudáveis, afectando pessoas de todas as idades.

Esta condição está associada ao aumento da morbilidade e mortalidade (Kalia 2005) não só devido ao aumento da predisposição para o suicídio, como também pela influência no prognóstico de outras doenças crónicas, nomeadamente a doença coronária, diabetes *mellitus* tipo 2 (Krishan e Nestler, 2008) e doenças autoimunes (Barnes, Alexopoulos *et al.* 2006; Demyttenaere, Bonnewyn *et al.* 2006). Nesta questão, é importante salientar que a relação entre a depressão e doenças crónicas parece ser bidireccional uma vez que a ocorrência de uma pode influenciar o prognóstico da outra.

Relativamente ao comportamento suicida, estima-se que 85 a 90% das tentativas de suicídio e suicídios consumados, são descritas em indivíduos com quadros de doença psiquiátrica (Kim *et al.*, 2008) ocorrendo, em 60% dos casos, num contexto de distúrbio de humor, nomeadamente, depressão (Cavanagh *et al.*, 2003). Em Portugal, o Ministério da Saúde estima que a depressão esteja associada à perda de mais de 1200 vidas por ano. É importante referir que a história familiar de suicídio constitui um factor de risco

independente do diagnóstico psiquiátrico do indivíduo (Tremeau *et al.*, 2005) e associa-se com tentativas suicidas mais violentas e letais (Viana *et al.*, 2006).

1.1.1 Factores de risco

Apesar do resultados dos estudos epidemiológicos revelarem uma certa concordância global, existem algumas diferenças importantes na prevalência da Depressão *Major* quando se comparam vários países ou mesmo várias regiões do mesmo país. Segundo Moreno *et al.* (2007) estas diferenças reflectem, sobretudo, a falta de uma metodologia científica comum, fruto da própria dispersão teórica sobre o tema, que não permite comparar dados.

Embora a prevalência da depressão seja difícil de estabelecer, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado, de uma forma geral, alguns pontos em comum, que se vão assumindo também como **factores de risco** para o desenvolvimento da depressão:

- o transtorno depressivo é cerca de duas vezes **mais prevalente em mulheres** do que em homens (Holmes 2001; Nardi 2006; Moreno 2007).
- independentemente do sexo e da idade, a prevalência da depressão é geralmente mais elevada entre indivíduos com **menor nível de escolaridade** (Martins da Silva *et al.*, 2011), que se encontram **desempregados** ou recentemente **divorciados** (Holmes, 2001). O *stress* associado a este tipo de situações é, muito provavelmente, um dos factores responsáveis pelo desencadeamento da depressão.
- o decurso de um quadro depressivo é muitas vezes paralelo a uma outra **doença crónica** (Harman *et al.*, 2005). Em doentes geriátricos, o factor precipitante mais comum no desenvolvimento de depressão é o *stress* provocado por uma doença física (Katon *et al.*, 1988).
- Outros factores de risco associados ao desenvolvimento de depressão têm por base alguns parâmetros socioculturais, nomeadamente a **condição socioeconómica** e a perda de um papel activo no seio da sociedade (reforma) (Gelder *et al.*, 2005).

1.1.2 Sintomas e diagnóstico

A principal característica de um quadro depressivo prende-se com a falta de iniciativa e a ausência de pensamentos positivos associados a um humor deprimido, bem distinto do sentimento ‘vulgar’ de tristeza. A perda de interesse no desempenho das actividades que trazem habitualmente algum prazer assim como a falta de concentração poderão ser outros factores de ‘alerta’. Na vertente **emocional**, as pessoas com depressão têm habitualmente pensamentos de culpa relativamente a acontecimentos passados e sentimentos de falha em tudo o que fazem.

Em **termos físicos**, a depressão é caracterizada por dores no corpo (cabeça, costas, ombros, dores generalizadas), falta de energia, distúrbios durante o sono, alterações repentinas de humor durante o dia e pela perda ou ganho de apetite e, conseqüentemente, peso. Nos casos de depressão severa, todos estes sintomas acabam por ser mais frequentes e intensos (Gelder *et al.*, 2005). A consequência mais grave associada a depressão major é a ideação suicida e o próprio suicídio (Gelder *et al.*, 2005).

A depressão distingue-se das habituais mudanças de humor pela gravidade e permanência dos sintomas, estando muitas vezes relacionada com a ansiedade. No entanto, não existe um quadro padrão de sintomas para esta condição, mas sim sinais recorrentes que podem indicar a patologia. Desta forma, não sendo uma condição simples e linear, com testes objectivos e concretos, o diagnóstico de depressão baseia-se num conjunto de aspectos emocionais e físicos que permanecem ao longo do tempo.

Critérios diagnóstico para Depressão Major

Humor deprimido
 Irritabilidade
 Baixa auto-estima
 Sentimentos de desespero, inutilidade e culpa
 Diminuição da capacidade de concentração e raciocínio
 Diminuição ou aumento do apetite
 Perda ou ganho de peso
 Insónia ou hipersónia
 Falta de energia, fadiga ou agitação
 Diminuição interesse pelas actividades que habitualmente dão prazer
 (ex.: sexo, interações sociais,...)
 Pensamentos recorrentes de morte e suicídio

O diagnóstico de depressão é estabelecido quando um determinado número dos sintomas acima referidos é reportado por um período superior a 2 semanas, e quando estes interferem na vida social e ocupacional do indivíduo (DSM IV, 2000).

1.1.3 Etiologia

A depressão, e de acordo com os critérios do '*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition*' (DSM-IV), engloba um conjunto de factores distintos de causas múltiplas. Não existe um padrão de diagnóstico estandardizado, mas apenas a expressão de um conjunto de **factores biológicos**, **psicológicos** e **sócio-culturais** (Kalia, 2005) que devidamente identificados, constituem a base multifactorial do distúrbio.

A importância dos **factores genéticos** é ilustrada por estudos realizados em gémeos monozigóticos, que evidenciam uma tendência familiar para a depressão em cerca de 40-50% dos casos (Hamet and Tremblay 2005). A identificação de genes associados à depressão, tem-se revelado bastante inconclusiva, provavelmente por se tratar de um síndrome complexo com características multigénicas.

Por outro lado, determinados acontecimentos de vida, comumente definidos como *'life events'*, podem provocar no indivíduo um sofrimento psíquico e uma consequente dificuldade de adaptação que conduz à depressão. Este tipo de acontecimentos, de que são exemplo o divórcio, o desemprego, a perda de um ente querido, ou um acontecimento traumático decorrido em algum momento da vida, funcionam apenas como factor de risco para a depressão uma vez que nem todos os indivíduos sujeitos ao mesmo acontecimento de vida desenvolvem depressão.

1.1.4 Patofisiologia

Segundo Urani *et al.* (2005) os episódios depressivos induzem alterações transitórias ou persistentes em várias regiões ou sistemas cerebrais. Desta forma, e independentemente dos diferentes sintomas que possam caracterizar um quadro depressivo, todos resultam de alterações neuronais ao nível da neurotransmissão em várias regiões do cérebro (Mann 2005).

Em consonância com a hipótese apresentada, défices em neurotransmissores como serotonina, dopamina, norepinefrina, assim como de ácido g-aminobutírico (GABA), BNF e somatostatina, têm sido propostos como factores implicados na origem da depressão (Mann 2005). Várias hipóteses têm sido referidas como associadas à sua patogénese (figura 1).

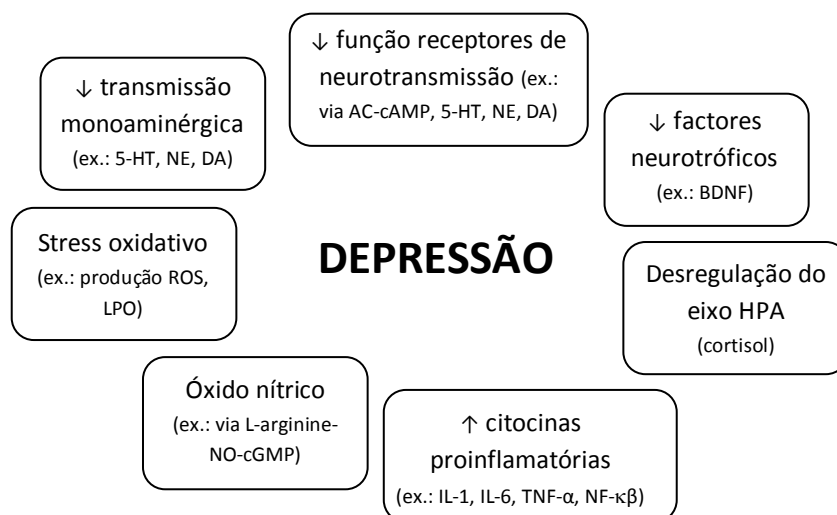


Figura 1. Hipóteses explicativas para a patogénese da depressão. Adaptado de Chopra *et al.* (2011)

1.1.4.1 Hipótese das monoaminas

As monoaminas são pequenos compostos orgânicos de que fazem parte os neurotransmissores. De acordo com o tipo de radical que a constitui, as monoaminas podem ser divididas em catecolaminas (radical catecol) de que são exemplo a dopamina, noradrenalina e adrenalina, ou em indolaminas (radical indol) como a serotonina.

As monoaminas produzem os seus efeitos através de mudanças bioquímicas complexas ao nível dos neurónios pós-sinápticos no sistema nervoso central (SNC), através da interacção com proteínas sinalizadoras (proteínas G) nas membranas celulares pós-sinápticas. Estas proteínas G, ligadas a receptores, e após estimulação das monoaminas, produzem mudanças na forma como os neurónios pós-sinápticos respondem aos neurotransmissores clássicos (glutamato e ácido aminobutírico).

Segundo a teoria das monoaminas, a depressão é causada pela deficiência de noradrenalina, serotonina e dopamina (Schildkraut, 1967; Akiskal e McKinney, 1973; van Praag, 1974; Willner, 2000; Shelton, 2004; Dunlop e Nemeroff, 2007) na fenda sináptica. Este decréscimo poderá estar associado a alterações na síntese, armazenamento e libertação destes neurotransmissores, implicando o envolvimento de vários metabolitos proteicos (figura 2).

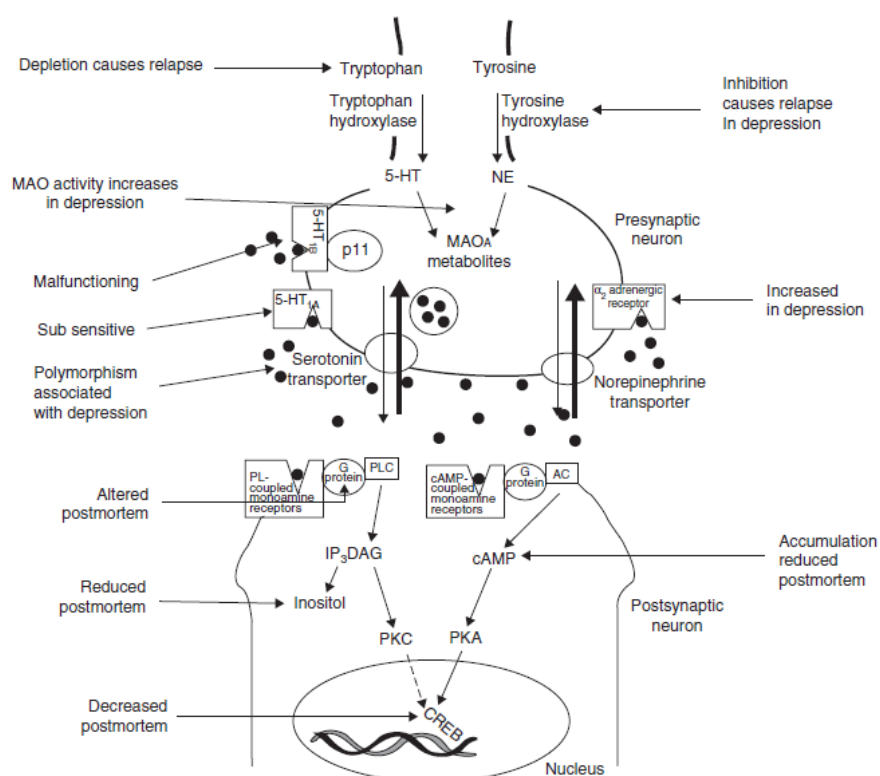


Figura 2. Hipótese das monoaminas. Adaptado de Chopra *et al.* (2011)

AC: Adenylatecyclase; CREB: cAMP response element binding; DAG: Diacylglycerol; IP₃: Inositol triphosphate; MAO: Monoamina oxidase; NE: Norepinefrina; PET: Positron emission tomography; PKA: Protein kinase A; PLC: Phospholipase C; TPH2: triptofano hidroxilase tipo 2.

A hipótese de que o sistema monoaminérgico influencie em alterações a nível comportamental, nomeadamente humor, vigília, motivação, fadiga, agitação psicomotora (Adrien, 2002; Ursin, 2002; Cools *et al.*, 2008), é apoiada pela localização e distribuição cerebral dos neurotransmissores (figura 3). Os corpos celulares dos neurónios serotoninérgicos encontram-se no núcleo de rafe (no tronco encefálico) e projectam-se para todas as áreas do cérebro, córtex cerebral, hipotálamo, tálamo, núcleo de base. A dopamina, por sua vez, tem origem nos centros do tronco cerebral, na área tegumental ventral e na substância negra, projectando-se para o córtex frontal, corpo estriado e giro do cíngulo anterior. A noradrenalina tem origem no *locus ceruleus* do tronco cerebral e projecta-se praticamente para todas as áreas do cérebro e medula espinal (hipotálamo, núcleos basais, sistema límbico e córtex cerebral). Estes neurotransmissores regulam a eficiência do processamento das informações dos circuitos cerebrais relacionados com vários sintomas de depressão, e que estão mencionados na figura 3 (Stahl, 2010).

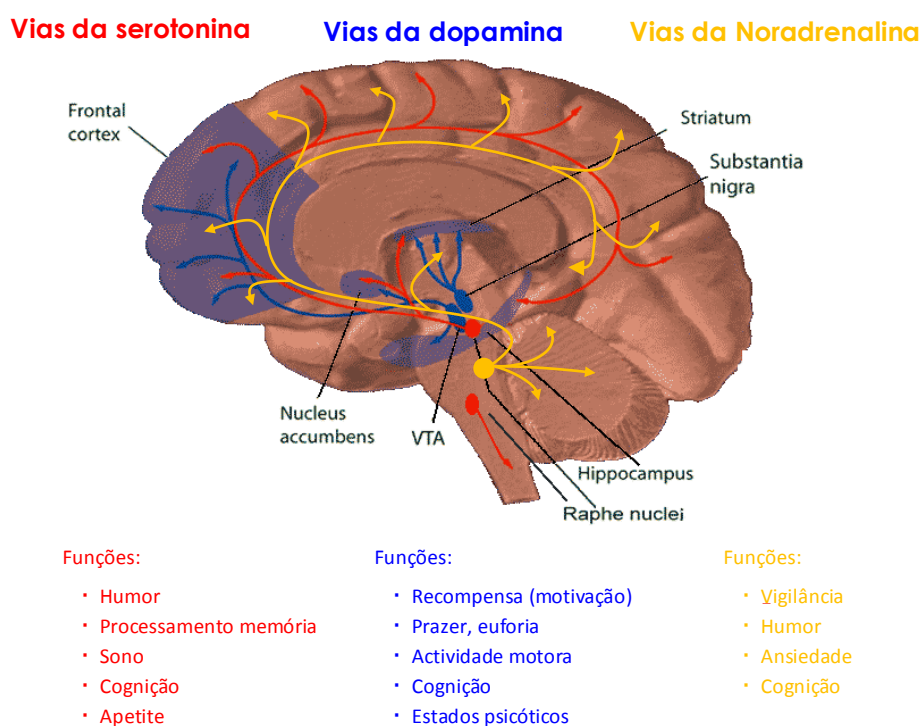


Figura 3. Localização e distribuição cerebral dos neurotransmissores (serotonina, dopamina e noradrenalina)

A maioria dos antidepressivos utilizados (inibidores dos transportadores das monoaminas (tricíclicos), inibidores selectivos do transportador da serotonina (SSRIs) e inibidores da enzima MAO) proporcionam acções farmacológicas que aumentam a concentração de neurotransmissores. Apesar deste aumento ser imediato, os efeitos clínicos são apenas visíveis após semanas e a remissão da doença ocorre em apenas 30% dos doentes deprimidos. Estas observações sugerem que a patofisiologia da depressão não é explicada exclusivamente pela teoria das monoaminas e que as terapêuticas aplicadas baseiam-se em dados empíricos e não em mecanismos de acção.

1.1.4.2 Hipótese dos receptores de neurotransmissores

De acordo com o já mencionado, as monoaminas interagem com segundos mensageiros a partir de receptores da membrana pós-sináptica. Desta forma, a depressão não está relacionada apenas com a quantidade de monoaminas disponibilizadas na fenda sináptica, mas também com o número e o mecanismo de acção dos receptores pós-sinápticos. Visto que os receptores não são estruturas estáticas, o seu número e afinidade são regulados por um conjunto de factores, nomeadamente concentração de neurotransmissores, que desencadeiam um mecanismo compensatório de sob ou sub expressão de receptores. Alguns estudos sugerem que a depleção de monoaminas provoca um aumento compensatório do número de receptores pós-sinápticos (up-regulation).

Segundo esta hipótese, existe a possibilidade da depressão ser caracterizada por uma deficiência na transdução de sinais (processo pelo qual um sinal externo é transmitido para o interior de uma célula, a fim de provocar uma resposta intracelular) entre o neurotransmissor e o neurónio pós-sináptico, que desencadeia uma série de eventos moleculares intracelulares, no sistema de cascata de transdução de sinais.

1.1.4.3 Hipótese das neurotrofinas

As disfunções de neuroplasticidade ou remodelação desempenham, actualmente, um papel importante na patogénese da depressão (Kiss, 2008). Vários estudos com suporte clínico têm demonstrado que o *stress* e a depressão levam à redução do volume total do hipocampo e à perda de células do sistema límbico (Czeh e Lucassen, 2007).

Segundo esta teoria, o factor neurotrófico derivado do cérebro, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) tem uma função importante nos mecanismos de depressão, uma vez que modula a plasticidade, inibe a cascatas de morte celular e aumenta os níveis de metabolitos proteicos responsáveis pela proliferação dos neurónios do Sistema Nervoso Central (SNC) (Peng *et al.*, 2008). Na base desta hipótese estão alguns estudos que associam a depressão a níveis reduzidos de BDNF. Como suporte para a hipótese apresentada, estudos efectuados em modelos animais demonstram a associação de estados depressivos a níveis reduzidos de BDNF no cérebro (Shirayama *et al.*, 2002).

1.1.4.4 Sistema hipotálamo - hipófise – adrenal

Em termos fisiológicos, o *stress* pode ser visto como uma reacção à ameaça, estando frequentemente associada à activação de uma via neuroendocrina específica conhecida por Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (de Kloet *et al.*, 2005). O *stress* estimula o hipotálamo induzindo a produção da hormona libertadora de corticotrofina ou 'Corticotropin-releasing-factor' (CRH). Esta hormona actua sobre a pituitária, induzindo a

libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) para a corrente sanguínea que, posteriormente, actua sobre o córtex adrenal, estimulando a libertação de glicocorticóides, nomeadamente, cortisol. O cortisol exerce um efeito de feedback negativo, inibindo a sua própria síntese. Actua em muitos órgãos e em várias regiões do cérebro através de dois tipos de receptores: receptores mineralocorticóides e receptores glicocorticóides (GR). Esta última classe de receptores apresenta uma distribuição específica e selectiva no cérebro, estando presente no hipocampo, amígdala e córtex frontal, áreas importantes no domínio da cognição.

Vários estudos referem que a desregulação no funcionamento deste eixo assim como o aumento dos níveis de glicocorticóides desempenham um papel central na patofisiologia da depressão. Sugerem, nomeadamente que a activação de GRs induzida pelo excesso de glicocorticóides pode: diminuir o processo de neurogénese no hipocampo (Krishnan e Nestler, 2008), induzir a retracção das dendrites apicais do hipocampo (McLaughlin *et al.*, 2007), induzir a morte neuronal (Yu *et al.*, 2008), aumentar a vulnerabilidade dos neurónios a espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Behl *et al.*, 1997). De uma forma geral, todos os eventos podem contribuir para a redução do volume do hipocampo, reportado em doentes com depressão.

1.1.4.5 Hipótese das citocinas

Esta hipótese sugere que a depressão é causada pela acção das citocinas. As citocinas são glicoproteínas produzidas por células do sistema imune que funcionam como moléculas sinalizadoras, responsáveis pela comunicação intercelular. As citocinas exercem uma função não só local como também sistémica, permitindo-lhes controlar as respostas imunes, assim com regular o processo de inflamação.

As alterações imunológicas na depressão têm sido descritas há mais de 2 décadas e uma das hipóteses correntes propõe que a inflamação excessiva tem um importante papel na depressão (Raison *et al.*, 2006). A imunidade inata pode desencadear dois tipos de resposta imunitária: mediada por células T *helper* tipo 1 (Th1) ou células T *helper* tipo 2 (Th2). Se, por um lado, durante a resposta Th1, os macrófagos activados segregam os chamados mediadores pro-inflamatórios como interferão alfa (IFN- α), factor necrose tumoral (TNF) e interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), a resposta Th2 é caracterizada pela produção de anticorpos e mediadores anti-inflamatórios como IL-4, IL-5 e IL-10, que inibem a resposta mediada por Th1. Este balanço entre Th1 e Th2 é fundamental na prevenção de uma inflamação excessiva que, não sendo controlado, pode ter sérias consequências.

Vários estudos têm demonstrado que doentes com depressão apresentam no plasma elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1, IL-2, IL-6, TNF e proteína C reactiva (PCR) (Zorrilla *et al.*, 2001; Tuglu *et al.*, 2003; Irwin *et al.*, 2007). Para além disso, neste coorte de doentes a razão entre IFN- e IL-4 está aumentada, verificando-se uma diminuição com tratamento antidepressivo (Myint *et al.*, 2005).

Pensa-se que o mecanismo através do qual as citocinas exercem o efeito no comportamento humano esteja relacionado em parte com a sua influência nos neurotransmissores, no processo de plasticidade sináptica e na função neuroendócrina (Raison *et al.*, 2006).

1.1.4.6 Via óxido nítrico

O óxido nítrico tem sido descrito como uma importante molécula mensageira existente no cérebro. Este gás solúvel altamente lipofílico, tem sido implicado na neurotransmissão, plasticidade sináptica assim como em processos associados à aprendizagem, percepção da dor, agressividade e depressão (Esplugues 2002). Os nNOS (enzimas responsáveis pela síntese de NO a partir de L-arginina), são encontradas em muitas áreas do cérebro associadas ao *stress* e depressão, nomeadamente, hipocampo, hipotálamo, *dorsal raphe nucleus* e *locus ceruleus* (McLeod *et al.*, 2001). Joca e Guimaraes (2006), demonstraram em modelos animais, que a redução dos níveis de óxido nítrico no hipocampo por administração de inibidores de síntese de NO, induziam efeitos antidepressivos, sugerindo a implicação deste elemento na neurobiologia do *stress* e do síndrome depressivo.

1.1.4.7 Stress oxidativo

O *stress* oxidativo tem sido implicado na patogénese de várias doenças, nomeadamente em doenças psiquiátricas (Ng *et al.*, 2008). Vários estudos têm demonstrado alterações em parâmetros do *stress* oxidativo na depressão. O hipocampo, assim como todo o cérebro, é especialmente vulnerável a danos causados por radicais livres, devido ao seu alto consumo de oxigénio, abundante quantidade de lípidos e relativa pobreza em enzimas antioxidantes. Tanto o *stress* psicológico (Matsumoto *et al.*, 1999) como o físico, podem modular as defesas antioxidantes e aumentar o dano oxidativo no cérebro. Num estudo realizado em animais submetidos a um protocolo de *stress* crónico variável, foi observado um aumento no anião peróxido no hipocampo e no córtex pré-frontal (Lucca *et al.*, 2009).

1.2 Depressão e doenças crónicas

As doenças crónicas estão constantemente associadas a um aumento na prevalência de sintomas depressivos (Wells *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 2001). Em alguns casos a depressão parece resultar de um conjunto de efeitos biológicos específicos da própria doença crónica, e que incluem doenças que afectam o Sistema Nervoso Central (SNC), nomeadamente, doença de Parkinson, Esclerose Múltipla, doença cerebrovascular. Outros casos levam a crer que esta associação possa ser mediada por mecanismos comportamentais, isto é, a limitação no desempenho de actividades correntes, imposta pela doença

crónica, proporciona um desinteresse gradual das actividades que são gratificantes para a pessoa (Prince *et al.*, 1998).

A depressão complica muitas vezes as doenças físicas crónicas, afectando de forma negativa a condição física, sendo por sua vez perpetuada por esta. Esta associação parece regida segundo uma vertente bidireccional: depressão como factor de precipitação das doenças crónicas e doenças crónicas como potenciais exacerbadores de sintomas depressivos.

Se, por um lado, o risco aumentado para a depressão possa estar associado à perda de condição física inerente à doença crónica e mediada por variáveis sócio-demográficas e características da própria severidade da doença, por outro, o efeito adverso dos sintomas depressivos nos cuidados de saúde, poderá explicar a co-ocorrência de depressão e doença crónica (Katon, 2003).

A depressão associada a uma doença crónica aumenta a incapacidade funcional (Moussavi *et al.*, 2007) constituindo um desafio acrescido no diagnóstico, classificação e tratamento de doença psiquiátrica (Katon *et al.*, 2007).

Os sintomas depressivos assumem, cada vez mais, um importante papel na etiologia, no decurso e na própria resposta associada às doenças crónicas (Chapman *et al.*, 2005). Desta forma, compreender a ligação entre doenças crónicas e sintomas depressivos, é um desafio para a melhoria dos cuidados de saúde.

1.3 Depressão e factores genéticos

1.3.1 Sistema serotoninérgico: os genes candidatos

O sistema serotoninérgico tem sido um dos mecanismos moleculares e biológicos mais estudados com implicação tanto na etiologia da depressão (Urani *et al.*, 2005) como na patogénese do comportamento suicida (Bondi *et al.*, 2006).

Descrito pela primeira vez há mais de 60 anos, o sistema serotoninérgico exerce um importante papel na modulação da actividade neuronal, estando implicado em vários processos fisiológicos que envolvem a função motora, sensorial, vascular e endócrina e, também em vários aspectos do domínio comportamental associados ao humor/disposição, agressividade, ansiedade, memória e cognição (Serreti *et al.* 2006).

Este sistema é composto não só pela serotonina como também por vários elementos moleculares responsáveis pela sua síntese, transporte, e um conjunto de receptores imprescindíveis ao processo da neurotransmissão (figura 4).

Das 7 subfamílias de receptores serotoninérgicos actualmente conhecidas (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) todos os subtipos (**5-HT₁**: 1A, 1B, 1D, 1E, 1F; **5-HT₂**: 2A, 2B, 2C; **5-HT₃**; **5-HT₄**, **5-HT₅**: 5A, 5B; **5-HT₆** e **5-HT₇**) são codificados por diferentes genes e têm padrões de distribuição distintos no SNC.

Estes receptores encontram-se localizados nas membranas pós-sinápticas e controlam o fluxo de electrões de forma a regular a resposta neuronal de excitação ou inibição. Alguns subtipos de receptores como 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, estão também localizados pré-sinápticamente nos somas, dendrites e terminações nervosas, onde funcionam como autoreceptores, atenuando o impulso neuronal e inibindo a libertação de 5-HT aquando da sua activação (Landolt e Wehrle, 2009).

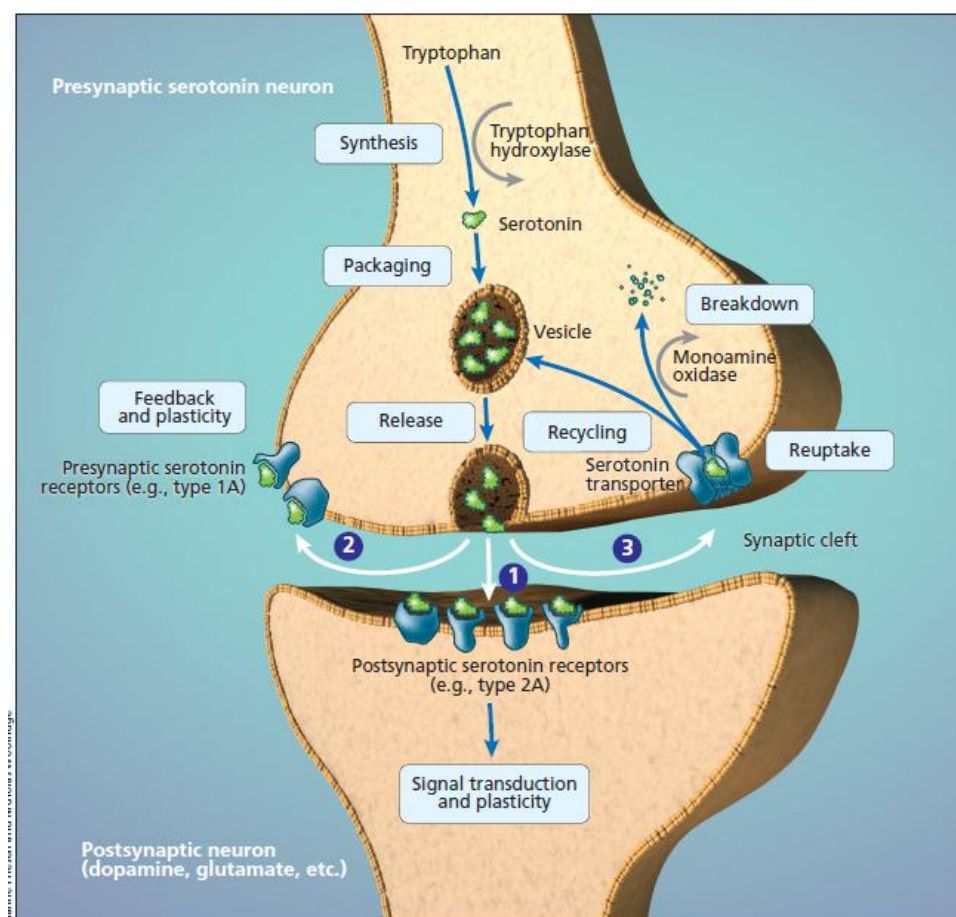


Figura 4. Sinalização serotoninérgica. Adaptado de het Rot *et al.* (2009).

A serotonina (5-HT) é sintetizada a partir do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH1 e 2). É depois armazenada em vesículas e posteriormente libertada na fenda sináptica, sempre que haja um estímulo do neurónio. A serotonina libertada no processo de neurotransmissão apresenta várias vias de actuação. (1) Liga-se aos seus receptores pós-sinápticos, induzindo a transmissão de sinais. (2) Liga-se aos receptores pré-sinápticos, induzindo o feedback que regula a plasticidade do neurónio. (3) é recapturada da fenda para o neurónio pré-sináptico, através do transportador de serotonina sendo depois reaproveitada ou metabolizada pela monoamina oxidase.

O sistema serotoninérgico desempenha uma função reguladora, mediando a maioria das funções cerebrais. Desta forma, a desregulação no seu funcionamento, seja pela diminuição da síntese ou degradação precoce de neurotransmissores, alteração na expressão ou função dos receptores ou mesmo erros na transdução de sinal, pode estar na origem de algumas doenças do foro neurológico e psiquiátrico (Roth, 1994; Roth e Xia, 2004) e na ideação/ comportamento suicida (Mann *et al.*, 2001).

Embora não tenha sido identificado um gene, ou um conjunto de genes, específico e determinante para o desenvolvimento da depressão, o que existem são pequenas variações no genoma, chamados polimorfismos genéticos que podem aumentar o risco para a depressão.

Vários estudos têm identificado um conjunto de polimorfismos funcionais, *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e *Variable Number Tandem Repeats* (VNTRs), nas regiões promotoras de vários genes implicados na sinalização serotoninérgica (figura 4). Dos genes que fazem parte deste sistema, tem sido dado especial destaque ao gene transportador da serotonina (5-HTT também conhecido como SLC6A4), ao gene TPH responsável pela síntese de triptofano hidroxilase que actua como enzima catalizadora na produção de serotonina, ao gene que codifica informação para a síntese da monoamina oxidase A (MAOA), responsável pela degradação do neurotransmissor, e ainda às subfamílias 1,2 e 3 dos receptores de serotonina. Alguns polimorfismos funcionais descritos nestes genes têm sido associados à depressão, *stress* pós-traumático, comportamento suicida assim como um conjunto de outros distúrbios de humor (Smith *et al.*, 2008; Uher e McGuffin, 2008).

TPH

A serotonina é sintetizada a partir do triptofano por intermédio da enzima triptofano hidroxilase (TPH). Actualmente, são conhecidas duas isoformas desta enzima, triptofano hidroxilase tipo 1 (TPH1) e tipo 2 (TPH2). Embora a TPH2 se encontre predominantemente expressa no cérebro, razão pela qual o gene responsável pela sua síntese tem merecido especial atenção nos estudos sobre a genética da depressão e do suicídio, a TPH1 desempenha uma função importante nos estadios finais de desenvolvimento do cérebro (Nielsen *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2006)(Nielsen, Jenkins *et al.* 1997; Nakamura, Sugawara *et al.* 2006). A diminuição parcial da síntese de serotonina no cérebro e o consequente défice de neurotransmissor libertado poderá estar associado a um conjunto de polimorfismos tanto no gene THP1 como no gene TPH2. Desta forma, atendendo à função que desempenham, os genes TPH, poderão ser genes de susceptibilidade para a depressão (Zill *et al.*, 2007/2009).

O gene TPH1 é caracterizado por dois SNP no intrão 7, A218C e A779C, e que estão em desequilíbrio de ligação. O polimorfismo A218C (rs1800532) está localizado num potencial local de ligação do factor de transcrição GATA, afectando a expressão do gene TPH1 (Nielsen *et al.*, 1997). Apesar de alguns estudos prévios demonstrarem associação desta variante com tentativas de suicídio, não existem resultados consistentes relativamente à associação com a depressão (Gizatullin *et al.*, 2006; Illi *et al.*, 2009).

Alguns estudos genéticos, incluindo estudos de haplotipos, têm explorado a associação de vários SNPs no gene TPH2 com a depressão e o comportamento suicida).(Lopez de lara *et al.*, 2007).

MAOA

A monoamina oxidase A (MAOA) é a enzima responsável pela degradação da serotonina, noradrenalina e dopamina. Sabol *et al.* (1998) descreveram um polimorfismo na região promotora do gene responsável pela sua síntese, que afecta de forma significativa o seu potencial de transcrição. Este polimorfismo do tipo VNTR, é caracterizado por um conjunto de variantes alélicas (2, 3, 3.5, 4 ou 5) que traduzem o número de cópias de uma unidade repetitiva de 30pb. Estudos funcionais demonstraram que os alelos com 3,5 e 4 repetições são os mais frequentes, apresentando uma actividade transcripcional 2 a 10 vezes mais eficiente do que as demais. Por sua vez, o alelo com 2 repetições é raro e apresenta uma baixa actividade de transcrição. Vários estudos em humanos e modelos animais têm explorado o papel deste polimorfismo na etiologia de diferentes padrões comportamentais.

Embora haja alguma discrepância entre os resultados obtidos por diferentes grupos de trabalho, alguns estudos de associação genética têm demonstrado uma maior frequência das isoformas mais activas desta enzima, não só em mulheres (Schulze *et al.*, 2000) e homens (Du *et al.*, 2002) deprimidos, como também em homens deprimidos que cometeram suicídio (Du *et al.*, 2002). Outros estudos sugerem ainda que a resposta a antidepressivos parece piorar na presença das variantes alélicas mais longas (3.5, 4 e 5) (Yu *et al.*, 2005; Domschke *et al.*, 2008).

5-HTT

O gene transportador da serotonina (5-HTT) contém na região promotora uma zona polimórfica caracterizada pela presença (alelo L, longo) ou ausência (alelo S, curto) de uma unidade repetitiva de 44pb. Este polimorfismo influencia a expressão do gene transportador de serotonina pelo que, indivíduos com genótipo LS ou SS apresentam uma menor expressão do 5-HTT quando comparados com indivíduos homozigóticos para o alelo L (Heils, 1996). Apesar de não estar descrita uma associação directa entre estas variações e a depressão, Caspi *et al.* (2003) propõe que estas possam moderar a influência dos eventos de *stress* na depressão.

Após esta publicação, vários estudos seguindo a mesma linha de investigação, replicaram os resultados descritos (e.g. Cervilla *et al.*, 2006; Zalsman *et al.*, 2006; Lazary *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2009; Drachmann *et al.*, 2009; Wray *et al.*, 2009). Contudo numa meta-análise que inclui 14 estudos, não foram encontradas evidências que sustentem a interacção entre 5-HTTLPR e os '*stressful life events*' no risco para depressão (Risch *et al.*, 2009). Numa meta-análise mais abrangente, Uher e McGuffin (2010) mostraram que 17 das 34 abordagens descritas, confirmavam as descobertas de Caspi (2003), 8 eram parcialmente replicadas e 9 não demonstravam qualquer relação de concordância. Estes autores sugerem ainda que as discrepâncias encontradas poderão estar associadas aos diferentes métodos utilizados, nomeadamente na avaliação dos fenótipos e dos factores ambientais.

HTR1A

Um outro polimorfismo, o rs6295 (C -1019 G), localizado na região promotora do gene receptor de serotonina 1A (HTR1A) tem sido também associado à depressão, ansiedade e risco de suicídio (Lemond *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2003). A presença do nucleótido G (-1019) altera o local de reconhecimento para a NUDR (factor transcripcional que funciona como repressor na expressão do 5-HT1A) resultando assim numa sobre expressão deste receptor na membrana do neurónio pré-sináptico (figura 5). Este aumento de expressão desregula o gradiente serotoninérgico reduzindo a neurotransmissão serotoninérgica (Lemond *et al.*, 2003).

Todos os estudos que observaram uma associação deste polimorfismo com a depressão encontraram também relação com outros genes (Anttila *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) e com genes e ‘negative life events’ (Zhang *et al.*, 2009). Num estudo mais recente, Mekli *et al.* (2011) confirmam a associação da variante acima descrita e propõe a contribuição de um outro polimorfismo neste gene (rs878567) para a depressão e ansiedade em indivíduos que reportam eventos de stress.

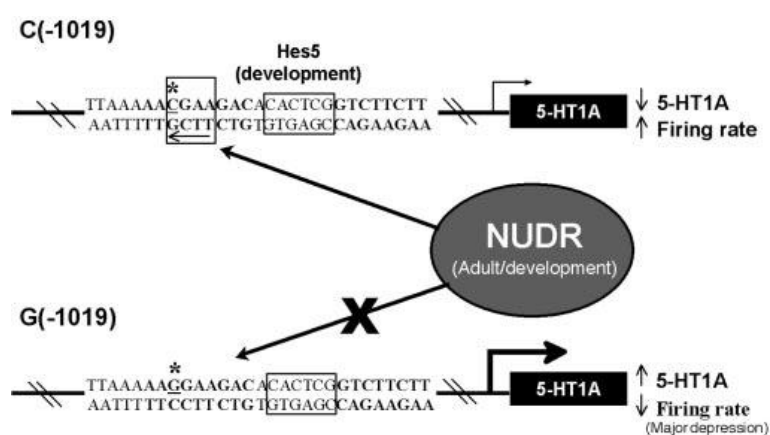


Figura 5. Modelo funcional do polimorfismo C(-1019G) no gene HTR1A (rs6295).

Adaptado de Lemond *et al.* (2003)

HTR1B

Este subtipo de receptor está localizado na membrana pré e pós-sináptica e parece regular a libertação de serotonina do ‘dorsal raphe nucleus’ (Lanfumeey e Hamon, 2004).

Até à data, e seguindo a linha de pesquisa da presente proposta, muito poucos são os estudos efectuados neste gene. Apenas um SNP (rs6296) foi associado à depressão (Huang *et al.*, 2003). Num estudo caso-controlo que pretendeu avaliar, em indivíduos com acompanhamento psiquiátrico, a relação entre o abuso de substâncias, a depressão e o polimorfismo G861C (rs6296) no gene HTR1B, ficou claro que os indivíduos com o alelo C apresentam uma maior predisposição para o consumo de substâncias e o

desenvolvimento de depressão (Huang *et al.*, 2003). Numa abordagem mais recente, Mekli *et al.* (2011) para além de confirmarem os resultados anteriormente descritos, salientaram o efeito desta variante como factor de susceptibilidade para o desenvolvimento de sintomas depressivos e de ansiedade, quando associados a eventos de *stress*.

HTR2A

O gene que codifica este receptor está localizado no cromossoma 13q14-q21 e é composto por 3 exões. Apesar de até à data terem sido identificados 299 SNPs com potencial associação a várias doenças neuropsiquiátricas, o interesse têm incidido essencialmente em três polimorfismos, T102C (rs6313), A1438G (rs6311) e His452Tyr (rs6314). Uma vez que os dois primeiros polimorfismos descritos [102 T/C (rs6313), 1438 A/G (rs6311)] estão em desequilíbrio de ligação, há a possibilidade de poderem ser considerados em conjunto.

O polimorfismo T102C é um SNP silencioso (não ocorre qualquer modificação na sequência aminoacídica do receptor), localizado no exão 1, perto da região promotora. Esta localização pode influenciar a estrutura secundária do transcrito, alterando a sua estabilidade e actividade traducional. A metilação do nucleótido C, tem sido proposta como um eventual mecanismo de bloqueio/redução da expressão do gene (Clifford *et al.*, 1996). Devido à sua localização em zonas potencialmente funcionais, a variante A1438G (rs6311), próxima da região promotora, assim como o polimorfismo His452Tyr (rs6314), na região C-terminal, podem influenciar os níveis de expressão deste receptor (Serreti *et al.*, 2007), diminuindo assim a sua disponibilidade no cérebro. De facto, alguns estudos já demonstraram que o polimorfismo rs6311, modula a expressão deste gene (Parsons *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2007). Dos vários estudos de associação realizados em diferentes populações, o alelo A deste polimorfismo foi associado a um maior risco para a depressão numa amostra da população Sueca (Jansson *et al.*, 2003) e Dinamarquesa (Christiansen *et al.*, 2007). Por outro lado, Choi *et al.* (2004), ao estudarem uma população Coreana, encontraram uma associação entre o alelo G e uma maior susceptibilidade para a depressão. Outras investigações, não reportaram qualquer associação entre o polimorfismo rs6311 e a depressão (Frisch *et al.*, 1999; Bonnier *et al.*, 2002; Kishi *et al.*, 2009).

HTR3A

O gene HTR3A codifica uma subunidade do canal iónico dependente de ligando que medeia a rápida transmissão sináptica excitatória (Maricq *et al.*, 1991), no entanto, a sua possível associação com distúrbios de humor permanece pouco clara.

Niesler *et al.* (2001) referem que a variante C do polimorfismo C -42T tem influência na expressão do receptor 3A, diminuindo o grau de eficiência da transmissão excitatória.

Num estudo recente, Gatt *et al.* (2010), pretendeu clarificar a ligação entre este SNP funcional e a depressão, e os resultados referem que indivíduos homozigóticos para o alelo C e expostos a eventos de *stress* apresentavam índices de depressão mais elevados quando comparados com indivíduos transportadores do alelo T. Não obstante á exposição a situações de *stress*, indivíduos homozigóticos CC revelaram uma perda de volume de massa cinzenta nas estruturas do hipocampo, sugerindo que o polimorfismo descrito exerce um papel importante na sua integridade.

1.3.2 COMT

O gene COMT, localizado no cromossoma 22, é responsável pela síntese da catecol-O-metiltransferase, uma enzima com papel importante no metabolismo das catecolaminas como a dopamina, epinefrina e noradrenalina. A variante mais estudada neste gene diz respeito a um polimorfismo funcional presente no codão 158. A substituição de uma Valina por uma Metionina afecta a actividade da enzima pelo que indivíduos homozigóticos A/A (Val) apresentam uma actividade enzimática 3 a 4 vezes superior aos indivíduos homozigóticos C (Lotta *et al.*, 1995).

Visto que os alelos são co-dominantes, a funcionalidade da COMT num indivíduo heterozigótico é intermédia entre as actividades enzimáticas dos homozigóticos.

Este polimorfismo tem sido estudado em várias doenças psiquiátricas incluindo ansiedade e perturbações de humor (Craddock *et al.*, 2006). Apesar de um estudo Europeu com 1512 participantes reportar uma associação entre o genótipo A/A e a depressão (Massat *et al.*, 2005), existem algumas investigações que, embora apresentando populações amostrais mais pequena, acabam por tornar o resultado inconsistente.

1.3.3 Apolipoproteína E

A apolipoproteína E é uma glicoproteína multifuncional, responsável pelo metabolismo e redistribuição de lipoproteínas e colesterol (Raber 2008). Nos humanos, a seguir ao fígado, o cérebro é o local de maior síntese de apoE, sendo produzida principalmente nas células glia, nomeadamente por astrócitos (Pitas *et al.*, 1987) e pela micróglia (Nakai *et al.*, 1996). A ApoE liga-se ao colesterol e aos fosfolípidos formando complexos, cuja captação é determinada por receptores da apoE presentes nos neurónios e células da glia.

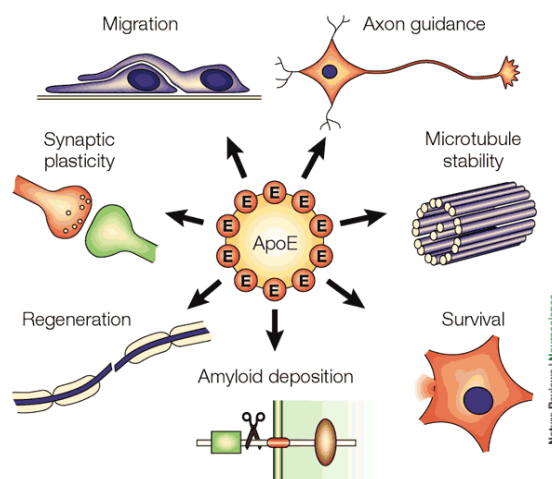


Figura 6. Funções neuronais que podem ser influenciadas pela ApoE. Adaptado de (Herz and Beffert 2000)

Cada vez mais tem sido explorado o seu papel em vários mecanismos biológicos, não directamente relacionados com o transporte de lipoproteínas mas que incluem a imunoregulação e a cognição. De acordo com a revisão feita por Herz e Beffert (2000), existem várias funções neuronais que podem ser influenciadas pela ApoE (figura 6), nomeadamente os processos de desenvolvimento, regeneração e protecção neuronal.

Nos últimos anos tem sido evidenciada a relação desta glicoproteína em diferentes patologias, nomeadamente, doença de Alzheimer (Bertran *et al.*, 2007), doença de Parkinson (Huang *et al.*, 2004), depressão na 3ª idade (Yen *et al.*, 2007), esquizofrenia e transtorno bipolar (Digney *et al.*, 2005).

O gene APOE é caracterizado por 3 variantes alélicas, e2, e3 e e4, possibilitando a existência de seis genótipos distintos: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 e E4/E4. As isoformas proteicas produzidas por estes alelos diferem na composição de aminoácidos (CYS - cisteína ou ARG-arginina) nas posições 112 e 158 da proteína (Weisgrater *et al.*, 1982; Mahley *et al.*, 1999). Tal como é visível na figura 7, o alelo e2 possui o aminoácido cisteína nas duas posições, o e3, alelo mais comum da ApoE, é caracterizado por uma cisteína na posição 112 e uma arginina na posição 158, enquanto o e4 possui argininas nestas duas posições.

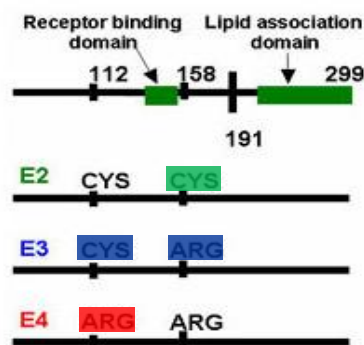


Figura 7. Isoformas proteicas da ApoE.

As 3 isoformas apresentam diferentes afinidades para a ligação com os diversos receptores. Comparativamente com as restantes isoformas, a E2 tem uma afinidade inferior 2% para o receptor LDL, actuando como factor de predisposição para a Hiperlipidémia tipo III. A variante alélica E3, codifica a forma ancestral da proteína sendo o alelo mais frequente na população. O alelo E4, presente em 24 a 40% das populações, tem sido implicado na doença de Alzheimer e na disfunção cognitiva.

1.4 Lupus Eritematoso Sistémico

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença inflamatória crónica, multissistémica, caracterizada pela auto-reactividade das células do sistema imune e pela inflamação induzida por complexos imunes. O LES pode estar na origem de um conjunto de manifestações clínicas bastante heterogéneas, podendo envolver inúmeros órgãos como pele, articulações, rins, sistema cardiovascular (figura 8) ou mesmo o sistema nervoso. Enquadrado nesta diversidade de manifestações, o diagnóstico de LES deve basear-se não só num conjunto de evidências clínicas, devidamente caracterizadas nos critérios de classificação do American College of Rheumatology (ACR), como também por um conjunto de parâmetros laboratoriais.

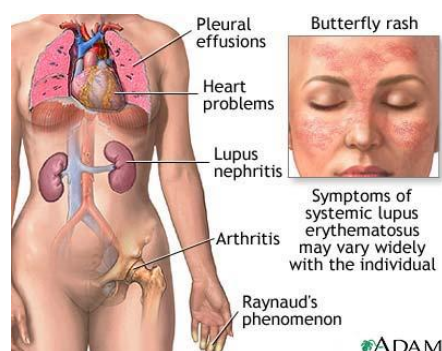


Figura 8. Principais manifestações clínicas do LES.

Em alguns casos, a própria condição incapacitante da doença associada a algumas características físicas específicas, como as alterações cutâneas a nível da face e a alopecia, acabam por ter um impacto negativo na forma como os doentes encaram a sua imagem, podendo estar na origem de alguns problemas ao nível das relações familiares, sociais e mesmo profissionais (Lahita 2000; Rahman *et al.*, 2008).

O LES é 9 vezes mais frequente em mulheres do que em homens, afectando predominantemente jovens em idade fértil.

Embora a prevalência e incidência do LES varie consideravelmente de país para país, esta condição é bastante mais frequente em populações não Caucasianas. A prevalência do LES varia, aproximadamente, entre 40 casos por cada 100,000 indivíduos no Norte da Europa a mais de 200 por cada 100,000 em

indivíduos de origem Africana (Johnson *et al.*, 1995). Em 2007, a prevalência de LES no Norte de Portugal foi calculada entre 18,8 e 29,5 casos por cada 100 mil indivíduos (Vasconcelos, 2007).

Como resultado de vários estudos epidemiológicos, a distinção de sub-populações entre doentes LES, caracterizadas distintamente de acordo com um conjunto de características clínicas específicas, permitiu sustentar a ideia de que a patogénese desta doença envolve um conjunto alargado de mecanismos (Tapanes *et al.*, 2000) cuja interacção levanta ainda bastantes questões. Curiosamente, e apesar do LES estar descrito com maior frequência e maior gravidade em indivíduos de raça negra nos EUA, a doença encontra-se pouco descrita na população Africana, sugerindo que o desenvolvimento de LES possa ter uma forte componente genética e ser influenciado por um conjunto de factores ambientais.

Por outro lado, o facto da doença ser bastante menos frequente em mulheres que não se encontram em idade fértil, sugere um importante papel das hormonas sexuais endógenas na predisposição da mesma (Mok e Lau, 2003).

1.4.1 Etiologia

Os eventos imunológicos que estão por trás das várias manifestações clínicas da doença não estão ainda completamente definidos. A perda de tolerância para os antígenos do *self* por parte das células imunes e o aumento da produção de auto anticorpos contra auto-antígenos são apenas alguns dos intervenientes na patogénese desta doença tão complexa (Mudd *et al.*, 2006; Valencia *et al.*, 2007). Apesar de estarem já descritos vários defeitos funcionais ao nível dos linfócitos, células *Natural Killer* (NK) e células apresentadoras de antígeno (APC) o papel principal, tanto nos estudos utilizando modelos animais como modelos humanos, é atribuído às células B (Anolik 2007). A formação de autoanticorpos pelos linfócitos B (plasmócitos) e a consequente formação de complexos autoimunes circulantes contribui para a desregulação do sistema imune através de um conjunto de mecanismos associados à deposição dos complexos autoimunes e à produção de proteínas pró-inflamatórias (Rahman *et al.*, 2008). Alguns estudos (Ronnelid *et al.*, 2003) descrevem ainda níveis anormais de citocinas relacionados com a actividade da doença.

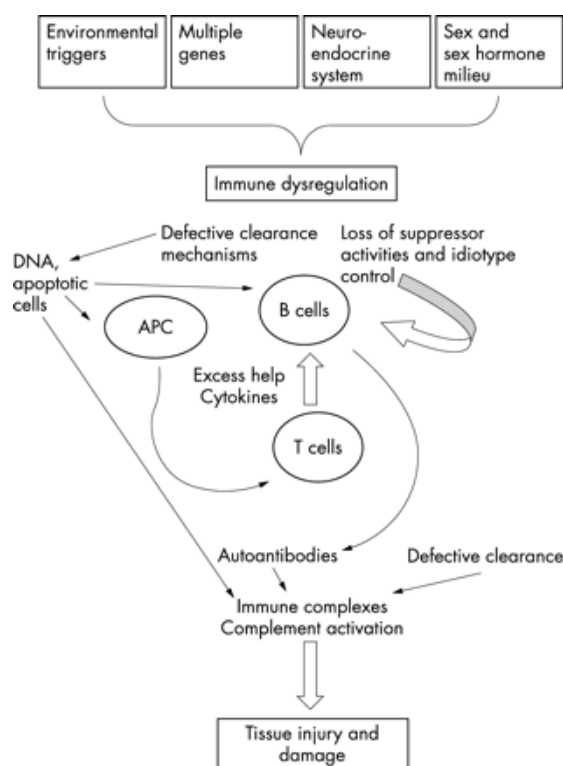


Figura 9. Factores que influênciam o desenvolvimento de LES. Adaptado de Mok and Lau (2000).

O tratamento do LES, tal como em qualquer outra doença, tem como principal objectivo aliviar os sintomas e tentar alterar o curso da doença, ou seja torna-la menos grave, de forma a tentar induzir estados prolongados de remissão, dado até ao momento não ser possível oferecer cura. Nos casos mais graves, são utilizados fármacos imunossupressores. O conhecimento sobre a patogénese da doença assim como o reconhecimento de características inflamatórias e imunológicas tem despertado o interesse para novas abordagens terapêuticas. Embora a etiologia do LES permaneça desconhecida, há consenso entre a comunidade científica quanto à origem multifactorial da doença, envolvendo não só uma componente genética e imunológica, como também um conjunto de factores ambientais e hormonais (figura 9).

1.4.1.1 Susceptibilidade genética

Estudos efectuados em gémeos monozigóticos e dizigóticos, permitem observar que a taxa de concordância é de 25% e 2%, respectivamente (Sullivan 2000).

A partir de *Genome Wide Association Studies* efectuados nos últimos anos, foram descritos 17 genes implicados quer na imunidade inata quer na imunidade adquirida e que predis põem para o desenvolvimento de Lupus. Numa revisão feita por Graham *et al.* (2009), com uma amostra de 1310 doentes com LES e 7859 controlos, confirmou-se o contributo dos genes HLA-DR2 e DR3 do Complexo Major de Histocompatibilidade para o desenvolvimento da doença.

1.4.1.2 Influência hormonal

Tal como foi referido anteriormente, o LES é nove vezes mais frequente em mulheres em idade reprodutiva do que em homens. Para além disso e de forma curiosa, os *flares* (agudizações) ocorrem muitas vezes durante a gravidez enquanto a remissão da doença acaba por ser mais comum depois da menopausa. Perante as evidências apresentadas, é sugerido, não se percebendo de forma clara o seu modo de actuação, que as hormonas femininas sejam importantes factores de regulação na actividade do LES (Zandman *et al.*, 2007).

1.4.1.3 Factores ambientais

Como referido, o desenvolvimento do Lúpus além de ter uma forte componente genética, é influenciado por um conjunto de factores ambientais.

Actualmente, é aceite que as infecções desempenham um papel importante no desenvolvimento da autoimunidade. Está bem documentado que agentes infecciosos, através do chamado mimetismo molecular (o agente infeccioso apresenta um epítipo estruturalmente semelhante a autoantígenos) desencadeiam uma resposta imune dirigida contra estruturas do próprio. Na maioria dos casos, não é uma infecção isolada, mas sim o conjunto de infecções ao longo da vida, que induzem uma doença autoimune em indivíduos geneticamente predispostos. Neste contexto, Edwards *et al.* (2006) demonstraram uma associação entre níveis elevados de anticorpos antinucleares (ANAs) na idade adulta e infecções específicas como a rubéola e o sarampo durante a infância.

Tem sido reportado em doentes com Lúpus, uma associação com a infecção pelo Vírus de Epstein-Barr (EBV). Segundo James *et al.* (1997), os doentes LES apresentam para além de um aumento considerável da prevalência do vírus, um aumento da produção de anticorpos para regiões proteicas homólogas a antígenos nucleares, sugerindo que este vírus possa estimular células específicas do sistema imunitário.

Além dos agentes infecciosos, a exposição a agentes físicos, nomeadamente a radiação UV, pode levar à inflamação, induzir a apoptose celular, ou causar dano num determinado tecido, explicando a associação entre a exposição solar e a indução ou exacerbação do LES (Mok e Lau, 2003). Por outro lado, num estudo bastante recente, Ritterhouse *et al.* (2011) sugere que baixos níveis de vitamina D levam ao aumento de produção de autoanticorpos em indivíduos saudáveis e que este mesmo défice está associado à hiperactividade dos linfócitos B e do TNF- α em doentes com LES.

Ainda que pouco abordado, os hábitos tabágicos representam outros dos factores que poderão ser um factor de risco para o desenvolvimento de LES (Freemer *et al.*, 2006), como está demonstrado no caso de outra doença autoimune, a artrite reumatóide (majka *et al.*, 2006).

Actualmente, o **stress** psicológico é considerado por alguns autores, como um importante factor no desencadeamento da doença e do seu agravamento (Kozora *et al.*, 2005). Alguns estudos sugerem que o *stress* induzido por eventos ocorridos ao longo da vida (ex: morte de um familiar, divórcio, etc) possa ser um factor de risco para a exacerbação da doença (Picardi *et al.*, 2001). É importante lembrar que não só o *stress* causa doença, mas também a própria doença causa *stress* significativo.

1.4.2 Fisiopatologia

A perda de tolerância por parte das células do sistema imune assim como o aumento da produção de autoanticorpos, caracterizado pela hiperactividade das células B, são importantes intervenientes nos mecanismos responsáveis pela doença (Mudd *et al.*, 2006; Valencia *et al.*, 2007).

Muitas das manifestações clínicas do LES estão associadas aos efeitos da circulação e deposição de complexos imunes em vários órgãos ou mesmo à acção directa dos anticorpos à superfície das células. Os complexos imunes, depositados nas membranas de um determinado órgão alvo, rins, pele, coração, etc, levam à activação do sistema complemento e à inflamação local.

A principal disfunção imunológica característica dos doentes com LES é a produção de autoanticorpos que, reconhecendo regiões específicas do próprio organismo, são facilmente encontrados no núcleo, citoplasma e à superfície das células. Dos vários anticorpos até agora caracterizados, os anticorpos antinucleares, como anti-ds-DNA e anti-Sm, são os mais característicos e estão presentes em mais de 95% dos doentes com LES constituindo um dos critérios de diagnóstico (Tan *et al.*, 1982). Apesar de existir uma associação entre alguns autoanticorpos e determinadas características clínicas do LES, como anticorpos anti-NMDA (N-Metil-D-aspartato) e o atingimento cerebral, anticorpos anti-Ro e problemas a nível cardíaco, anticorpos anti-ds-DNA, anti-nucleossomas, anti-Sm e o envolvimento renal, não é clara a patogenicidade destes autoanticorpos pelo que os mecanismos imunológicos associados ao dano causado continuam por esclarecer.

1.4.3 Envolvimento do Sistema Nervoso Central

Os sintomas neuropsiquiátricos são bastante comuns nos doentes com LES. Nos últimos anos, muito possivelmente devido aos avanços na área terapêutica, os principais órgãos atingidos pelos LES e responsáveis por grande parte da morbilidade associada à doença – rim, pulmão, pele e músculos, têm sido associados a resultados mais favoráveis. De forma contrastante, na medida em que é prestada uma maior atenção para as manifestações do LES no SNC, têm sido detectados mais casos. A prevalência destes casos varia entre 37 a 91% (Ainiala *et al.*, 2001; Brey *et al.*, 2002; Hanly, 2005) e está associado a um vasto conjunto de manifestações neuropsiquiátricas, integrando sintomas neurológicos e psiquiátricos. Estes sintomas incluem: disfunção cognitiva, ansiedade, depressão, psicose, estado confusional agudo

convulsões, enxaquecas, mielopatia e polineuropatias (ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature, 1999).

A falha na aplicação de um método padronizado de entrevista psiquiátrica e de avaliação neuropsicológica é muito possivelmente responsável pela disparidade de valores de prevalência descritos na literatura.

Estudos recentes sugerem que os mecanismos fisiopatológicos desta condição possam incluir lesões dos pequenos vasos, produção de autoanticorpos, efeito das citocinas e dano directo no tecido cerebral (Brey 2007). Pensa-se que os sintomas são resultado de lesões vasculares e que manifestações mais difusas estão mais provavelmente relacionadas com o efeito dos autoanticorpos ou a acção mediadora das citocinas (Kasama *et al.*, 2008).

Apesar de alguns anticorpos, nomeadamente anti-ribossoma P e anti-NMDA, serem frequentemente encontrados no soro e líquido cefalorraquidiano de doentes LES com atingimento do SNC, existe ainda uma relação controversa na associação à depressão e disfunção cognitiva (Kowal *et al.*, 2007). Tendo em conta o papel das citocinas na imunopatologia do LES, Dean e colaboradores sugeriram alguns efeitos directos e indirectos destes mediadores inflamatórios no SNC, assumindo que o seu desequilíbrio é crucial para o desenvolvimento da doença. A sobreexpressão de citocinas no cérebro, gerada no decurso da doença autoimune, torna-se uma fonte atractiva para o envolvimento do SNC (Tomita *et al.*, 2004).

A comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central poderá resultar na activação do primeiro, estimulando assim as células gliais e/ou neuronais. Esta activação leva à sobre produção de citocinas pro-inflamatórias (Tomita *et al.*, 2004) que, por sua vez, induzem a síntese de espécies de oxigénio reactivas, principais responsáveis pelo dano no tecido cerebral. Se esta desregulação permanecer, e se a produção de citocinas não for suprimida, a inflamação poderá agravar, contribuindo para a disfuncionalidade cognitiva e afectiva.

1.4.4 Depressão em doentes com LES

As manifestações do LES no SNC podem ser muito diversas. Tal como referido anteriormente, a ausência de métodos padronizados e nomenclaturas concretas explica, na sua grande maioria, a variação dos resultados encontrados, reduzindo a possibilidade de comparação entre artigos publicados e limitando, em certa medida, o desenho dos estudos. De forma muito particular, os distúrbios psiquiátricos associados ao LES variam numa gama bastante extensa não só na etiologia como também na forma de apresentação, podendo ocorrer isoladamente ou em associação. Diferentes estudos descrevem que cerca de metade dos doentes com LES é afectado por um distúrbio psiquiátrico (Punrandare *et al.*, 1999) dependendo esta de factores psicossociais, efeitos iatrogénicos e alterações de foro imune (Hanly 2005; Ballok 2007).

No âmbito das manifestações neuropsiquiátricas, a depressão tem sido descrita como um dos sintomas mais prevalentes em doentes com LES (Inverson *et al.*, 2001; Kozora *et al.* 2006; Abdel *et al.* 2008), ocorrendo muitas vezes como primeira manifestação da doença. Contudo, a depressão nestes doentes mantém um carácter controverso, permanecendo ainda muitas questões por esclarecer. A depressão estará associada ao efeito da própria doença crónica ou, por outro lado, será uma manifestação específica do envolvimento do sistema nervoso central?

A própria conjectura da doença crónica pode ser factor precipitante de um estado depressivo. A reacção a determinados sintomas físicos e dolorosos, a limitação na actividade profissional e mesmo no relacionamento familiar assim como a mudança na imagem frequentemente associada ao decurso da doença, são alguns dos factores psicosociais que poderão contribuir de forma directa para a ocorrência da depressão. Por outro lado, existem também outros factores de risco que incluem distúrbios psiquiátricos concomitantes, dano cerebral directo ou mesmo a administração de corticoesteróides (Jennekens *et al.*, 2002; Nery *et al.*, 2007). De acordo com esta perspectiva, a inflamação cerebral, deposição de complexos imunes nas membranas das células neuronais, expressão de citocinas e a disfunção de neurotransmissores têm sido apontadas como possíveis causas para a depressão em doentes LES, tal como descrito em modelos animais (Tsai *et al.*, 1994; Conti *et al.*, 2004; Lapteva *et al.*, 2006; Ballok 2007; Zandman *et al.*, 2007).

De acordo com o anteriormente descrito, a etiologia da depressão em doentes com LES tem um carácter multifactorial, incluindo portanto um conjunto de factores genéticos, imunológicos, neuroquímicos, metabólicos, psicológicos e psicosociais (Inverson *et al.*, 1998). Algumas características comuns entre LES e depressão, como a variação de peso, fadiga, distúrbios durante o sono são alguns dos factores de confundimento no diagnóstico de depressão. Também por essa razão, a depressão em doentes com LES continua a ser uma importante área de estudo.

OBJECTIVOS

II. OBJECTIVOS

Nos doentes com LES a presença de um quadro depressivo pode ser o reflexo do atingimento do SNC ou, por outro lado, ser a expressão de um conjunto de parâmetros incapacitantes inerentes à própria doença. O quadro depressivo não tem um fenótipo “standard” pelo que é importante a identificação de mecanismos biológicos que possam explicar as diferenças individuais no funcionamento cognitivo e psicológico. Estes mecanismos biológicos podem traduzir-se num risco aumentado para o desenvolvimento da depressão e, em situações extremas, para o comportamento suicida.

Objectivos gerais:

- Aprofundar os conhecimentos sobre a patologia em questão, tanto na sua componente clínica como genética e, fundamentalmente, compreender os mecanismos neurobiológicos envolvidos no desenvolvimento da depressão;
- Correlacionar dados laboratoriais com parâmetros clínicos.

Objectivos específicos:

- Analisar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos em genes do sistema monoaminérgico, nomeadamente, no gene HTR1A, HTR2A, TPH1, TPH2 e COMT, em doentes LES com e sem depressão e doentes Neurolupus e não Neurolupus;
- Estudar a variabilidade do gene APOE e a susceptibilidade para a depressão e atingimento do SNC em doentes com LES.
- Avaliar a existência de associação entre a frequência dos diferentes polimorfismos estudados e a susceptibilidade para o LES;

Gene	SNP em estudo
HTR1A	rs6295
HTR2A	rs6311
TPH1	rs1800532
TPH2	rs1386494 rs1843809
COMT	rs4680

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População em estudo

No presente trabalho, para análise dos SNPs em estudo, foram investigados 355 pacientes com LES, provenientes da região norte (Porto) e Sul do país (Lisboa) e cujo diagnóstico foi efectuado de acordo com os critérios do ACR. Do total de doentes recrutados prospectivamente da consulta externa da Unidade de Imunologia Clínica do Hospital de Santo António (HSA), 67 foram direccionados para uma consulta de neurologia e para uma avaliação neuropsicológica. Desta coorte de doentes, foram recolhidos dados clínicos e algumas informações demográficas, nomeadamente, idade, sexo, atingimento do LES no SNC, avaliação de depressão e ansiedade e avaliação cognitiva. Como população controlo, para verificação das frequências alélicas dos polimorfismos em estudo, foi utilizado um conjunto de 198 indivíduos saudáveis, recrutados igualmente dos Centros de Dadores do norte e Sul do país.

3.1.1. Caracterização clínica

O diagnóstico de LES foi efectuado de acordo com os critérios estabelecidos pelo American College of Rheumatology (ACR). Os doentes foram direccionados para a consulta de neurologia onde, através da aplicação de uma bateria de testes e uma série de exames complementares, foram classificados como Neurolupus e não Neurolupus, diferenciando-se desta forma os doentes LES com ou sem envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) de acordo com os critérios ACR (1999) e com base na experiência clínica do médico. À população em estudo foi ainda aplicado o *Mini Mental State Examination* (MMSE), para avaliação de competências cognitivas básicas, assim como a *Hospital Anxiety and Depression Scale* (HADS), para rastreio de ansiedade elevada e humor deprimido.

O MMSE é um questionário com 30 perguntas que avalia diversos parâmetros de memória e orientação e que permite fazer um rastreio de alterações cognitivas. Para uma pontuação igual ou superior a 25 pontos, considera-se o indivíduo perfeitamente normal. Abaixo deste valor, podemos considerar, défice cognitivo severo (<9 pontos), moderado (10 a 20 pontos) e ligeiro (21 a 24 pontos) (Mungas 1991).

A HADS foi desenhada de forma a possibilitar aos clínicos fazer um rastreio de depressão e ansiedade, permitindo assim uma avaliação do estado emocional do doente (Zigmond e Snaith, 1983). A HADS consiste num conjunto de 2 subescalas, cada uma com sete questões, e para as quais existe 4 possibilidade de resposta, pontuadas de 0 a 3. As pontuações finais de depressão e ansiedade são obtidas separadamente e podem variar entre 0 e 21. Neste estudo, e baseado no resultado de estudos anteriores (Garcia e Pereira, 1995; Bjelland *et al.*, 2002; foi considerado um 'cut-off' de 8 como indicador de um doente com sintomas depressivos.

Uma vez caracterizada, a coorte de doentes foi dividida em grupos: (a) doentes com LES com depressão (HADS ≥ 8) e sem depressão (HADS < 8), (2) doentes LES com atingimento do SNC (Neurolupus) e sem atingimento do SNC (não Neurolupus); (3) doentes com LES e controlos.

3.2 Amostras biológicas

Amostras biológicas de sangue periférico foram colhidas de indivíduos com diagnóstico LES e população controlo, por punção venosa, para tubos de colheita, já preparados com um anti-coagulante – EDTA.

3.3 Estudos genéticos

3.3.1 Estudos de associação

Nos estudos de associação comparam-se dois grupos distintos (doentes *versus* controlos; doentes LES deprimidos *versus* doentes LES não deprimidos) com o objectivo de avaliar se determinadas variantes genéticas são mais frequentes num determinado grupo. Presume-se que os alelos que predisõem à doença sejam mais frequentes em doentes, quando comparados com a população controlo, da mesma maneira que os alelos que possam oferecer protecção contra o desenvolvimento da doença sejam mais frequentes em indivíduos controlos.

3.3.2 Single Nucleotide Polymorphisms – SNP

Os polimorfismos são variações na sequência da molécula de DNA. A variação mais frequente que ocorre no genoma humano são os chamados SNPs. Estas variações são caracterizadas pela alteração de um único nucleótido e podem ocorrer em qualquer região do genoma.

Para a depressão, assim como para muitas outras doenças neuropsiquiátricas igualmente complexas, acredita-se que ocorra a interacção de um série de variantes genéticas em *loci* distintos, principalmente SNPs que, embora isoladamente possam não ter um papel significativo, podem gerar risco ao interagir com outras variantes e também com factores não genéticos (Hunter *et al.*, 2008; Hyman 2008).

3.3.3 Selecção de genes candidatos e determinação dos SNPs

Após uma revisão de literatura a respeito de genes de susceptibilidade para a Depressão, e tendo em conta o papel fulcral das monoaminas no desenvolvimento desta patologia, foram seleccionados genes que de alguma forma estejam implicados no sistema monoaminérgico. Através da utilização do banco de dados

público dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e baseado no resultado de estudos realizados por outros grupos de pesquisa, foi feita uma primeira selecção de 20 SNPs. Eliminaram-se alguns SNPs que embora descritos como associados à depressão, apresentavam, para a população Europeia, uma frequência do *alelo minor* inferior a 0.15. Assim, tendo em conta o papel dos genes no sistema monoaminérgico e o possível efeito das suas variantes, deu-se preferência a SNPs já descritos em estudos anteriores como associados á depressão e que apresentassem um OR superior a 1.5.

1ª análise

20 SNPs localizados em genes do sistema monoaminérgico
(HTR1A, HTR2A, HTR2B, TPH1, TPH2, COMT, MAOA, SLC6A4)

2ª análise

16 SNPs

4 SNPs
Freq. *alelo minor* <1.5

3ª análise

10 SNPs
OR < 1.5

6 SNPs
OR > 1.5

- HTR1A rs6295
- HTR2A rs6311
- TPH1 rs1800532
- TPH2 rs1386494 e rs1843809
- COMT rs4680

3.3.4 Extracção de DNA: método ‘salting-out’

O DNA (ácido desoxirribonucleico) genómico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, utilizando uma modificação do método clássico de “Salting Out”, descrito por (Miller *et al.*, 1988). Este método, baseado na baixa solubilidade das proteínas na presença de elevadas concentrações de sais, permite a extracção de um grande quantidade de DNA, revelando-se uma importante vantagem sempre que se pretende armazenar e conservar o DNA.

Numa 1ª fase isolaram-se as células mononucleares (leucócitos), centrifugando as amostras de sangue a 2000rpm, durante 10 minutos. Após centrifugação, obteve-se uma fase celular (eritrócitos e buffy coat – anel leucócitos) e uma fase líquida (soro). Retirou-se o plasma e o buffy coat (com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo Falcon de 50mL, aos quais se adicionaram 50mL de RCLB (“Red cell lysis buffer”), homogeneizou-se e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente procedeu-se a uma centrifugação a 2000rpm, durante 10 minutos a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante (glóbulos vermelhos e outros componentes celulares) e o *pellet* de leucócitos foi submetido a novas lavagens com RCLB e consecutivas centrifugações (com os mesmos parâmetros), até se obter um *pellet* completamente branco.

Na fase seguinte adicionou-se ao *pellet* 3,5mL de tampão TE-2 (Tris-EDTA), 200μL de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) e 10μL da enzima Proteinase K. O SDS é um detergente que activa a enzima e, juntamente com o TE-2, promove a lise membranar, possibilitando assim a libertação de DNA e das proteínas intracelulares.

Após agitação no vórtex, a amostra foi incubada de um dia para o outro a 42°C, possibilitando a acção digestora da enzima sobre as células lisadas. Um vez digerida, a amostra foi transferida para um tubo cónico de 15mL e ao qual se adicionou 1mL de NaCl (Cloreto de sódio) 6M. Este tampão salino precipita as proteínas, rebentando as membranas dos leucócitos e libertando desta forma o DNA para o meio. Depois de agitada no vórtex, a solução foi submetida a agitação lenta num agitador magnético durante 10 minutos, até que a mistura apresentasse um aspecto leitoso resultante da precipitação das proteínas. Seguidamente procedeu-se a uma centrifugação a 3000rpm, durante 30 minutos a 23°C, permitindo separar o sobrenadante que continha o DNA, do precipitado de proteínas. Assim, transferindo-se o sobrenadante para um Falcon de 15mL e desprezando-se o conteúdo proteico, promoveu-se finalmente a precipitação de DNA adicionando ao tubo 20mL de etanol absoluto frio (-20°C). O Etanol desidrata a molécula de DNA obrigando-a a sair da solução possibilitando assim e após inversão repetida do tubo, a formação de um novelo de DNA. Depois de lavado com 5mL de etanol frio a 70°C, o novelo de DNA é ressuspenso em tampão TE buffer num *ependorf* de 1,5mL. A quantidade de TE utilizada para ressuspenso o DNA foi determinada pela observação empírica do tamanho do novelo. Numa etapa final, deixou-se o DNA durante algumas horas num agitador rotativo para que pudesse entrar em solução.

3.3.5 Genotipagem MassARRAY iPLEX – Sequenom

Para a genotipagem dos polimorfismos em estudo foi utilizado o método iPLEX da plataforma Sequenom MassARRAY (figura 10).

Este método compreende uma reacção inicial de PCR, de forma a amplificar as regiões de interesse, à qual se segue uma reacção de extensão utilizando primers com massa modificada que hibridizam na região adjacente ao polimorfismo de interesse. Numa fase final, utilizando um espectrómetro de massa é facilmente distinguida a massa dos primers de extensão, possibilitando desta forma a identificação dos alelos.

Esta metodologia permite a realização de várias reacções de PCR num único poço de uma placa de PCR (multiplex), proporcionando um método rápido, eficiente e bastante sensível para genotipagem em larga escala.

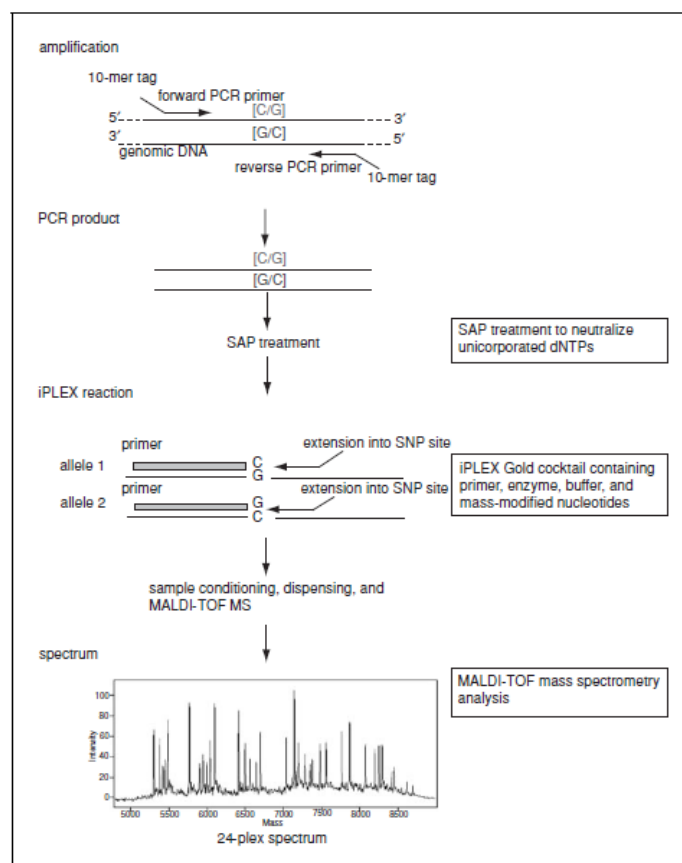


Figura 10. Representação esquemática de uma reação iPLEX.

3.3.5.1 Desenho dos primers e compatibilidade de SNPs

Após a escolha dos SNPs, foi criada um ficheiro com as sequências da região do gene que compreendia cada SNP em estudo. As sequência em formato FASTA incluíam 500pb, 250pb *upstream* e 250pb *downstream* do SNP de interesse, que deveria ser representado por, por exemplo (A/G).

Tanto os primers de amplificação como os de extensão foram desenhados a partir da plataforma de apoio do Sequenom, *MassARRAYDesigner*. Este software verifica e evita não só a formação de dímeros entre primers como também a formação de produtos de extensão sem complementaridade e que possivelmente resultariam numa extensão não específica.

Quanto maior for o número de sequências introduzidas no input do software, maior a probabilidade de haver uma combinação compatível para que possam ocorrer um total máximo de 40 reacções multiplex por poço, possibilitando, desta forma, a genotipagem simultânea de 40 SNPs.

3.3.5.2 Isolamento e quantificação do DNA

Tal como mencionado e descrito anteriormente, a extracção do DNA foi feito através do método “salting-out”, ao qual se seguiu a sua quantificação espectrofotométrica, utilizando um Nanodrop. Uma vez verificado o grau de pureza (A260/A280) e as concentrações de DNA, e visto que, devido à sensibilidade do método, a reacção de amplificação necessita apenas de 2 a 10ng de DNA, foram feitas diluições com volume final de 200µL e concentração final de 2,5ng/µL.

3.3.5.3 Amplificação do DNA para genotipagem

Reacção em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR foi introduzida por Mullis *et al.* (1986) e consiste basicamente na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, de forma exponencial, simulando o processo de replicação que ocorre *in vivo*. Esta reacção é caracterizada por um conjunto de ciclos que compreendem 3 fases distintas: desnaturação do DNA, ‘annealing’ dos primers específicos para posterior amplificação da região de interesse, e por fim a extensão de DNA através da Taq Polimerase.

Para que a reacção possa ocorrer convenientemente são necessários primers ‘forward’ e ‘reverse’ que, reconhecendo regiões complementares específicas de DNA, flanqueiam a região de interesse; os dNTPs, necessários para a síntese de novas cadeias de DNA; e um solução buffer que contenha MgCl₂, co-factor da Taq Polimerase, e sem o qual esta não consegue exercer a sua função.

A desnaturação ocorre a temperaturas elevadas (94°C), permitindo que as cadeias de DNA se separem de forma a que, na fase seguinte e a temperaturas específicas, os primers possam ligar-se, por complementaridade, às cadeias simples. A temperatura de annealing é bastante mais baixa que a temperatura de desnaturação e varia de acordo com as propriedades de ‘melting’ dos primers e da sequência de DNA. Por último, a fase de extensão ocorre a 72°C. Estas etapas são repetidas consecutivamente em vários ciclos (30 a 45) de forma a que no final da reacção se possam obter quantidades expressivas da sequência pretendida.

Protocolo da reacção de PCR

Reagente	V(1 reacção)	1 placa (384 poços)*	C _{final}
10x PCR buffer	0.5 µL	240 µL	1x
MgCl ₂ (25mM)	0.4 µL	192 µL	2mM
dNTP's (25mM cada)	0.1 µL	48 µL	0,5mM
Taq Polimerase (5U/µL)	0.2 µL	96 µL	0.2U
PCR primer mix (500nM cada)	1.0 µL	480 µL	100nM
H ₂ O estéril	1.8 µL	864 µL	-
TOTAL	4.0 µL	1920 µL	

* 25% excesso

Uma vez preparada a solução, utilizando uma pipeta multicanal, foram adicionados 4 μL da solução em cada poço. Em seguida, utilizando o nanodispenser, foi adicionado 1 μL de DNA e procedeu-se a um *spindown* de 1000rpm. A placa foi colocada no termociclador com a seguinte programação: 94°C durante 2 minutos, 45 ciclos de 94°C - 30 segundos, 56°C – 30 segundos, 72°C – 1 minuto, e uma extensão final de 72°C durante 1 minuto, à qual se segue a finalização a 4°C.

3.3.5.4 Remoção dos dNTPs não incorporados (reação SAP)

Antes de proceder à reação de extensão, é necessário tratar o produto da reação de PCR com fosfatase alcalina (shrimp alkaline phosphatase-SAP) de forma a desfosforilar os nucleótidos que não foram incorporados nos produtos amplificados. A SAP cliva o fosfato dos dNTPs não incorporados, convertendo-os em dNDPs, tornando-os assim não funcionais nas reações seguintes.

Protocolo da reação SAP

Reagente	V(1 reação)	1 placa (384 poços)	C _{final}
Enzima SAP (1.7 U/ μL)	0.30 μL	144 μL	0.07x
SAP buffer (10x)	0.17 μL	81.6 μL	0.24U
H ₂ O estéril	1.53 μL	734.4 μL	-
TOTAL	2 μL	960 μL	

Uma vez preparada a solução, utilizando o nanodispenser, foram adicionados 2 μL da solução em cada poço que continha o produto amplificado. Em seguida, após um *spindown* a 1000 rpm, a placa foi colocada no termociclador com o programa: 37°C durante 40 minutos e 85°C durante 5 minutos.

3.3.5.5 Reação iPLEX (reação de extensão)

Esta reação, conhecida por '*single base extension*' apresenta a particularidade de usar uma termo sequenase para incorporar ddNTPs modificados, diferenciados pela massa. Esta reação de extensão pós-PCR gera pequenos produtos de DNA que possuem um valor de massa específico baseado em cada alelo, possibilitando, numa etapa posterior e através do espectrómetro de massa, determinar o valor de cada um e, assim, identificar o alelo em questão.

Protocolo da reacção iPLEX

Reagente	V(1 reacção)	1 placa (384 poços)	C _{final}
Buffer de extensão (10x)	0.200 µL	96 µL	0.2x
Mix terminação (22.5x)	0.200 µL	96 µL	0.5x
Primer mix (7µM:14 µM)	0.804 µL	385.92 µL	0.73µM:1.46µM
Enzima de extensão (22.5x)	0.041 µL	19.68 µL	0.5x
H ₂ O estéril	0.755 µL	362.4 µL	-
TOTAL	2.000 µL	960 µL	

Uma vez preparada a solução, utilizando o nanodispenser, foram adicionados 2 µL da solução a cada poço que continha o produto amplificado e que anteriormente foi sujeito à reacção SAP. Em seguida, após um *spindown* a 1000 rpm, a placa foi colocada no termociclador com a programação: 94°C durante 30 segundos, 40 ciclos de 94°C – 5 segundos, 52°C – 5 segundos, 80°C – 5 segundos (2 últimos, repetidos 5 ciclos) 3 uma extensão final de 72°C durante 3 minutos.

No final da reacção, adicionou-se a cada poço 16 µL de água e cobriu-se a placa com uma resina de forma a 'limpar' a reacção, removendo o excesso de dNTPs assim como possíveis contaminantes hidrofóbicos. Agitou-se a placa num agitador automático durante 15 minutos e em seguida centrifugou-se a 5000rpm durante 5 minutos.

3.3.5.6 SpectroCHIP Array

Após realização do protocolo acima descrito, o produto de reacção de extensão é transferido para um chip, uma vez mais através da utilização do Nanodispenser, e expostos a um laser de alta intensidade, ao sofrerem ionização, possibilitaram a determinação do valor de massa associado ao alelo específico dos diversos SNPs em estudo.

3.3.5.7 Análise dos dados

O MALDI-TOF gera um espectro que contém picos produzidos pelos produtos de extensão. Os genótipos são inferidos pela comparação das massas dos picos obtidos com a massa dos produtos de extensão esperados. O resultado do espectro é processado pelo software Sequenom Typer Analyzer (figura 11) que gera o resultado do genótipo de cada amostra. Após verificação das genotipagens, o sistema possibilita, por intervenção do utilizador, corrigir possíveis erros de leitura e interpretação de dados.

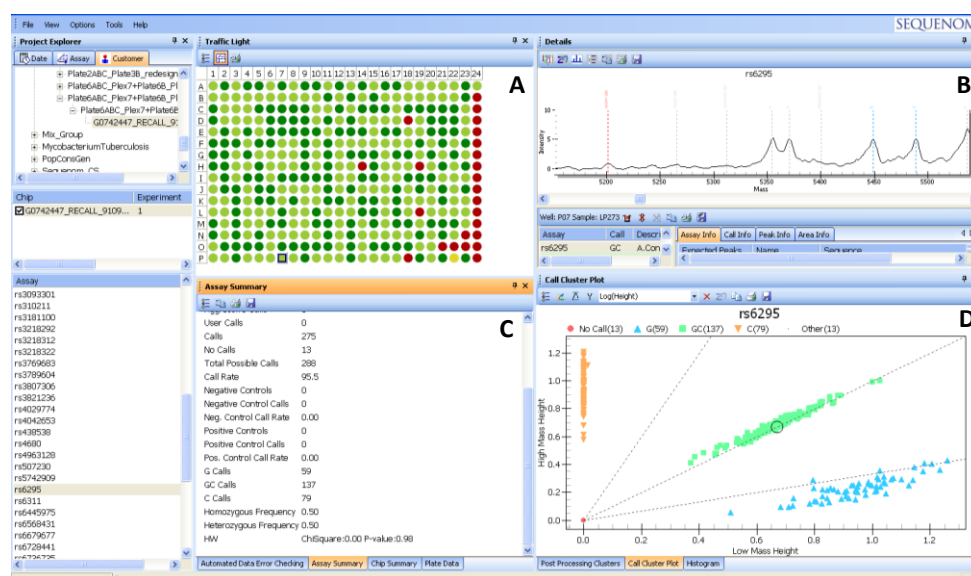


Figura 11. Output do Sequenom Typer Analyzer.

A - Localização da amostra no chip; **B** – espectro onde são detectados os produtos de extensão alélica, diferenciados pela massa; **C** - resumo das características do ensaio onde é possível verificar se a distribuição genotípica para cada SNP está em equilíbrio de Hardy-Weinberg; **D** - distribuição genotípica das amostras em estudo para o SNP do gene HTR1A (rs6295) onde, ▽ representa indivíduos homozigóticos CC (n=79), ■s indivíduos heterozigóticos GC (n=137) e ▴ indivíduos homozigóticos GG (n=79).

3.3.6 Genotipagem ApoE

3.3.6.1 PCR-RFLP restriction fragment length polymorphism analyses

A técnica de RFLP baseia-se fundamentalmente na acção de enzimas de restrição que, reconhecendo locais específicos do DNA promovem o seu corte possibilitando desta forma a obtenção de um padrão de restrição específico que permitirá fazer a identificação das variantes alélicas.

Este padrão é obtido através de uma electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Uma vez que o DNA é composto por nucleótidos de carga idêntica, o único critério de separação baseia-se no peso molecular e tamanho do fragmento. Assim, aplicando uma corrente eléctrica à matriz de separação, as moléculas mais pequenas correm mais rapidamente do que as moléculas com maior peso molecular, obtendo-se assim, um padrão de restrição específico e visível à luz ultra violeta, após coloração com brometo de etídeo.

Os polimorfismos no gene ApoE foram avaliados por PCR-RFLP, com a enzima de restrição Hin6I.

Protocolo da reacção de PCR

Reagente	1 gel (26 poços)	C _{final}
Flexi Buffer (5x)	52 µL	1x
dNTP's mix (25mM)	2.08 µL	0,20 mM
Primer forward (10mM)	26 µL	1,00 mM
Primer reverse (10mM)	26 µL	1,00 mM
DMSO (10)	26 µL	1
MgCl ₂ (25mM)	10.40 µL	1.00 mM
Taq Polimerase (5U/µL)	2.60 µL	0.05 U/µL
H ₂ O estéril	62.92 µL	-
TOTAL	208 µL	

Foram distribuídos 2µL de DNA (50ng/µL) nos respectivos tubos *ependorf*. Em seguida e uma vez preparada a master mix, foram distribuídos 8µL de solução por cada tudo, num volume total de reacção de 10µL. As amostras foram introduzidas no termociclador com a programação: 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C a 1minuto, 65°C a 1minuto e 70°C a 2 minutos, uma extensão final de 72°C durante 5 minutos e manter a 4°C até ao termino.

Protocolo de digestão com a enzima Hin6I

Reagente	1 gel (26 poços)	V _{final/poço}	C _{final}
Hin6I (10U/µL)	6.5µL	0.25µL	0.25 U/µL
Tampão	19.5µL	0.75µL	
TOTAL	208 µL	1µL	

Foram distribuídos por novas *strips*, 1µL da master mix preparada, procedendo-se, posteriormente à transferência de 4µL do produto amplificado para estes tubos de reacção. As amostras foram então para a estufa a 48°C onde permaneceram de um dia para o outro, de forma a promover a acção da enzima de restrição. A enzima Hin6I reconhece dois locais específicos no gene da ApoE, permitindo-nos desta forma, caracterizar as suas variantes alélicas, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados.

3.3.6.2 Gel Poliacrilamida a 8%

A poliacrilamida resulta da mistura de dois polímeros com propriedades distintas. A conjugação entre diferentes concentrações de acrilamida, uma molécula linear e a bisacrilamida que tem a forma de “T”, permite a criação de uma matriz mais ou menos compacta, possibilitando assim diferentes gradientes de separação. No caso concreto em estudo, visto que o tamanho dos fragmentos gerados após a acção da

enzima de restrição, não varia de uma forma muito expressiva, traduzindo-se em diferenças de pequenos pares de bases, a utilização de um gel de poliacrilamida a 8%, possibilita a visualização do padrão pretendido. O gel de poliacrilamida apresenta um maior poder de resolução do que o habitual gel de agarose.

Antes de proceder à preparação do gel propriamente dito, preparou-se devidamente o suporte para o mesmo. Limpam-se os vidros com álcool de forma a garantir que nenhuma sujidade ou poeira pudesse influenciar negativamente a polimerização do gel, devido à formação de bolhas de ar. Uma vez verificadas as condições do material, vedou-se o bordo inferior do conjunto dos vidros de forma a prevenir possíveis fugas. De seguida transferiu-se o conjunto montado para o respectivo suporte e procedeu-se à preparação do gel.

Protocolo preparação do gel

Reagente	Volume
dH ₂ O	19,0mL
40% Poliacrilamida Mix	8,0mL
10x TBE buffer	3,0mL
TEMED	20μL
APS 10%	350μL
TOTAL	30mL

Homogeneizou-se a solução preparada e, com o auxílio de uma pipeta de 25mL, esta foi depositada entre os vidros previamente montados á qual se seguiu a introdução dos pentes. Após polimerização do gel durante um período de aproximadamente 30 minutos, retirou-se o sistema de vidros do suporte e retirou-se a fita cola do bordo inferior. Seguiu-se a transferência do sistema de vidros para a tina vertical de electroforese. Introduziu-se na tina o tampão de electroforese (TBE 1x), retirou-se o pente e procedendo-se ao carregamento do gel com as amostras digeridas. Numa etapa final, ligou-se a tina a uma fonte de alimentação, dando-se início à electroforese com uma voltagem de 150mV.

Uma vez decorridas, aproximadamente 4 a 5 horas, transferiu-se, com as devidas precauções, o gel do sistema de vidros para um recipiente com a solução de coloração (50μL de brometo de etídeo para 1L água). Passados 20 minutos procedeu-se à visualização do gel por meio de um transiluminador associado a um sistema de captação de imagem (figura 12).

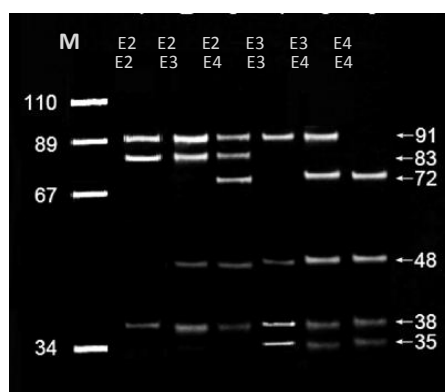


Figura 12. Genótipos da ApoE obtidos por PCR-RFLP com utilização da enzima Hin6I.

3.4 Análise estatística

Para a análise das variáveis categóricas foram realizados os testes de Qui-quadrado e Teste exacto de Fisher. O teste *t student* foi utilizado para avaliar variáveis contínuas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado nos polimorfismos estudados utilizando o teste de χ^2 .

Para a análise das frequências alélicas aplicou-se uma regressão logística binária *stepwise forward*, onde as variáveis independentes foram sendo introduzidas, até que a adição de uma nova variável independente não acrescentasse mais informação ao modelo. Este método permite avaliar as relações de dependência de uma variável dependente a partir do comportamento de uma ou várias variáveis independentes. Considerou-se como estatisticamente significativo, valores de *p* inferiores a 0,05.

Todas as análises foram efectuadas recorrendo ao software SPSS versão18 (SPSS, Chicago Illinois, USA).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Características dos doentes com avaliação neuropsicológica

A população dos 67 doentes com avaliação neuropsicológica foi caracterizada para um conjunto de características clínicas e demográficas descritas na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização da população com avaliação neuropsicológica

	LES (n=67)	HADS ≥ 8 (n=30)	HADS <8 (n=37)	P
Sexo				0.622 ^a
Fem.	94%	29	34	
Mas.	6%	1	3	
Idade (média)	41.4	48.2	35.9	<0.001 ^b
Escolaridade				0.014 ^a
< 9 (anos)		16 (53%)	8 (22%)	
≥ 9 (anos)		14 (47%)	29 (78%)	
Neurolupus		13 (43.3%)	17 (46.0%)	1.000 ^a
Não Neurolupus		17 (56.6%)	20 (54.0%)	
MMSE				0.439 ^a
≥ 25 (s/ alteração cog.)		26 (87%)	32 (91,4%)	
21 - 24 (ligeira alt. cog.)		3 (10%)	2 (5,7%)	
10-20 (alt. cog. moderada)		1 (3%)	1 (2,8%)	

^a Teste Qui-quadrado

^b t-test

Relativamente aos parâmetros descritos verifica-se que população de doentes com avaliação neuropsicológica é predominantemente composta por doentes do sexo feminino (94%), com uma idade média de 41.4 anos. Verifica-se ainda um aumento significativo da média de idades em doentes LES que apresentam um *score* de HADS superior ou igual 8. De forma semelhante, o quadro depressivo tem maior prevalência em doentes com índices de escolaridades mais baixos. Nesta coorte (n=67), 43,3% dos doentes que apresentam um quadro depressivo, têm também diagnóstico de Neurolupus.

4.2 Polimorfismos nos genes HTR1A, HTR2A, TPH1, TPH2 e COMT

O sistema monoaminérgico, devido à sua acção na modulação da actividade neuronal, tem sido explorado em várias doenças neuropsiquiátricas. Vários SNPs em genes que fazem parte deste sistema têm sido descritos, mas apenas alguns parecem ser relevantes para depressão.

Utilizando a estratégia proposta no capítulo dos materiais e métodos, foi escolhido um conjunto de 5 genes candidatos (HTR1A, HTR2A, TPH1, TPH2 e COMT), para um total de 6 SNPs.

Para melhor descrever os resultados obtidos, optou-se por dividir a análise em três partes: correlacionar os SNPs com a depressão em doentes com LES (HADS); com o atingimento do SNC nos doentes com LES (Neurolupus); com o LES propriamente dito.

4.2.1 HADS

Com o objectivo de responder a uma das principais questões do trabalho proposto, verificar se algum dos polimorfismos descritos como associados à depressão é um factor de susceptibilidade para o desenvolvimento da depressão em doentes com LES, foram analisadas as frequências alélicas e genotípicas nos doentes LES com um quadro depressivo (n=30) e doentes LES sem depressão (n=37).

Tabela 2. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, na população de doentes LES com depressão (HADS ≥ 8) e sem depressão (HADS < 8).

	Alelo	HADS ≥ 8 (n=30)	HADS < 8 (n=37)	OR	p
rs6295	C	0.50	0.57	1.38	ns
	G	0.50	0.42	0.72	
rs6311	A	0.57	0.50	0.765	ns
	G	0.43	0.50	1.308	
rs1386494	C	0.85	0.72	0.445	0.051
	T	0.15	0.28	2.245	
rs1843809	G	0.17	0.27	1.852	ns
	T	0.83	0.73	0.540	
rs4680	A	0.50	0.46	0.850	ns
	G	0.50	0.54	1.176	
rs1800532	A	0.30	0.42	1.682	ns
	C	0.70	0.58	0.594	

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências dos alelos e dos genótipos entre doentes com LES deprimidos e doentes com LES não deprimidos (tabela 2).

4.2.2 Neurolupus

As frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo foram também comparadas entre os doentes LES com atingimento do Sistema Nervoso Central (Neurolupus, n=30) e doentes não Neurolupus (n=37).

Tabela 3. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, nos doentes Neurolupus e não Neurolupus.

	Alelo	NL (n=30)	Não NL (n=37)	OR	p
rs6295	C	0.55	0.54	0.963	ns
	G	0.45	0.46	1.039	
rs6311	A	0.55	0.51	0.864	ns
	G	0.45	0.49	1.158	
rs1386494	C	0.80	0.76	0.778	ns
	T	0.20	0.24	1.286	
rs1843809	G	0.18	0.26	1.539	ns
	T	0.82	0.74	0.650	
rs4680	A	0.53	0.43	0.667	ns
	G	0.47	0.57	1.500	
rs1800532	A	0.45	0.297	0.517	ns
	C	0.55	0.703	1.934	

Não foram observadas associações estatisticamente significativas para nenhum dos polimorfismos em estudo (tabela 3).

4.2.3 LES

As frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo foram comparadas entre a população total de doentes com LES (n=355) e a população controlo, composta por indivíduos saudáveis (n=187).

Tabela 4. Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes em estudo, na população total de doentes LES e na população controlo.

	Alelo	LES (n=335)	Controlos (n=187)	OR	p
rs6295	C	0.52	0.57	0.818	ns
	G	0.48	0.43	1.223	
rs6311	A	0.50	0.41	1.380	0.012
	G	0.50	0.59	0.725	
rs1386494	C	0.81	0.86	0.708	ns
	T	0.19	0.14	1.413	
rs1843809	G	0.20	0.15	1.474	ns
	T	0.80	0.85	0.678	
rs4680	A	0.42	0.43	0.963	ns
	G	0.58	0.57	1.038	
rs1800532	A	0.37	0.41	0.850	ns
	C	0.63	0.59	1.176	

Dos SNPs em estudos, apenas o rs6311, localizado no gene HTR2A, apresenta uma frequência do alelo A significativamente superior em doentes LES, quando comparados com a população controlo (50% vs 41%, $p=0.012$, OR=1.38 (IC: 1.07-1.78)).

As frequências alélicas e genotípicas tanto para doentes como para controlos, encontram-se representadas na figura 13.

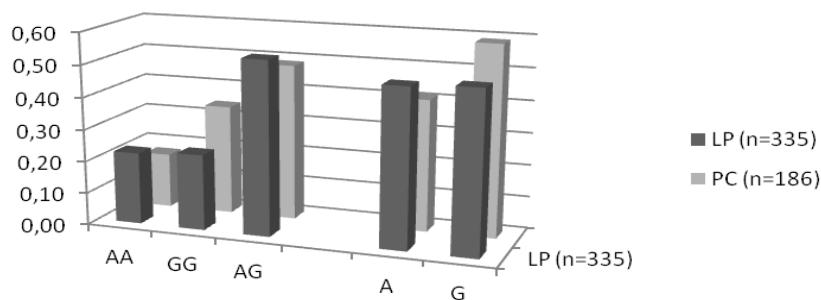


Figura 13. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs6311, do gene HTR2A, na população total de doentes com LES (LP) e população controlo (PC).

4.3 Apolipoproteína E

As frequências alélicas e genotípicas do gene APOE entre doentes LES com e sem depressão e doentes Neurolupus e não Neurolupus, está representada na tabela 5.

Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismo da apoE nos doentes LES com e sem depressão, e nos doentes neurolupus e não neurolupus.

	HADS ≥8 (n=28)	HADS <8 (n=32)	p	NL (n=28)	Não NL (n=32)	p
Alelos						
E*2	8.9%	4.7%	0.353	5.6%	7.6%	0.659
E*3	75%	85.9%	0.129	81.5%	80.3%	0.870
E*4	16.1%	9.4%	0.268	13.0%	12.1%	0.890
Genótipos						
E*2/ E*3	17.9%	9.4%	0.335	11.1%	15.2%	0.576
E*3/ E*3	53.6%	71.9%	0.142	18.5%	24.2%	0.503
E*3/ E*4	25%	18.8%	0.558	66.7%	60.6%	0.886
E*4/ E*4	3.6%	0%	0.281	3.7%	0%	0.281

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as populações estudadas, quer para as frequências alélicas quer para as frequências genotípicas.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

5.1 Depressão e Neurolupus

A depressão é um dos distúrbios psiquiátricos mais comuns constituindo por isso um grave problema de saúde pública. Vários estudos têm evidenciado a presença de sintomatologia psicopatológica, nomeadamente depressão e ansiedade em doentes com LES (Stoll, Kauer *et al.* 2001; Sweet, Doninger *et al.* 2004; Barbosa, Ferreira *et al.* 2010). Embora a etiologia da depressão e muito particularmente da depressão em doentes LES, não esteja ainda completamente definida, sabe-se que factores genéticos, imunológicos, neuroquímicos, metabólicos, psicológicos e psicosociais (Iverson, Harnish *et al.* 1998) podem levar à sua expressão.

A existência de manifestações comuns (sonolência e fadiga) no LES e na depressão, constituem factores de confundimento no diagnóstico o que torna difícil individualizar estas duas entidades no contexto da sua co-expressão.

Embora se reconheça, cada vez mais e tal como referido anteriormente, que a depressão é resultado de um conjunto de factores, no caso concreto da depressão em doentes LES surgem questões ainda mais complexas. Nesta doença, a depressão pode surgir na sequência do envolvimento do LES no SNC ou, por outro lado, estar relacionada com um conjunto de aspectos inerentes à própria actividade da doença, nomeadamente, a incapacidade e/ou transformação física do doente.

Embora o presente estudo não nos permita responder a esta questão, observamos que tanto doentes com Neurolupus como doentes sem Neurolupus, reportam quadros depressivos. Ressalva-se no entanto, a dificuldade em estabelecer o diagnóstico de Neurolupus. Segundo os critérios de diagnóstico ACR, é necessária a expressão de 4 parâmetros de um total de 11. Estas 11 características, todas diferentes, permitem obter um total de 120 combinações possíveis de critérios de diagnóstico. Associada a esta dificuldade, encontra-se também a condicionante das escalas de depressão utilizadas. No caso concreto do presente trabalho, foi utilizada a escala HADS que, sendo um teste de aplicação simples, feito num determinado dia, a uma determinada hora, funciona apenas como uma ferramenta para o *screening* de sintomas depressivos, não podendo desta forma ser utilizado para o diagnóstico preciso de depressão.

Dadas as características da população em estudo, verificou-se que os sintomas depressivos privilegiam a população mais envelhecida ($p=0.001$) e com níveis de escolaridade mais baixos ($p=0.014$). De facto, ao contextualizar as diferentes épocas temporais, e o estilo de vida das pessoas com mais idade, compreendemos mais facilmente a forma com estas variantes condicionam a vida moderna, podendo contribuir como factor de risco para o desenvolvimento dos comportamentos depressivo. A diminuição natural do nível de actividade física com o avanço da idade, pode também proporcionar situações de *stress*, indutoras de sintomas depressivos.

O presente trabalho tinha como principal objectivo analisar a distribuição alélica de vários polimorfismos em genes do sistema monoaminérgico, apresentando a originalidade e singularidade de estudar um coorte de doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico.

Em 2011 Leal *et al.*, demonstraram que doentes com LES homozigóticos para o genótipo 120TT do HTR2A (rs6313) eram mais susceptíveis à depressão. O estudo efectuado por estes autores incidu sobre uma população de 51 doentes com LES, que constituem ¼ da população estudada neste trabalho e no qual foi explorado o SNP rs6311. Dado estes SNPs (rs6313 e rs6311) estarem em desequilíbrio de ligação, seria de esperar que o polimorfismo rs6311 tivesse alguma associação com o desenvolvimento da depressão. Apesar dos doentes serem os mesmos, não foram observados resultados estatisticamente significativos para este SNP. Ainda que estes dois polimorfismos sejam silenciosos, a ausência de associação pode ser explicada pela localização destes SNPs relativamente à região promotora do gene. De facto o polimorfismo rs6313 pode exercer uma maior influência sobre a região promotora, podendo afectar a estrutura secundária do transcrito, alterando a sua estabilidade e actividade traducional.

Relativamente ao gene TPH2, o polimorfismo rs1386494, apresenta em valor de p próximo da significância ($p=0.051$). À semelhança de outros estudos (Zill *et al.*, 2004) que descrevem um aumento da frequência do alelo G nos casos de depressão (0.86 vs 0.79, $p=0.012$, OR=0.60), também a população de doentes com LES com depressão neste estudo apresenta uma maior frequência deste alelo, quando comparada com a população LES sem depressão (0.85 vs 0.72, $p=0.051$, OR=0.445). Neste caso, o aumento da amostra pode permitir esclarecer o significado desta observação. O SNP rs1843809 tem sido referido como modelador da resposta aos antidepressivos como a fluoxetine (Peters, Slager *et al.* 2004) no entanto, tal como descrito por Zill e colaboradores, não encontramos nenhuma associação deste SNP com a depressão.

Para o polimorfismo rs1800532 no gene TPH1, e tal como tem sido reportado por vários estudos realizados em populações caucasianas (Du, Bakish *et al.* 2001; Illi, Setälä-Soikkeli *et al.* 2009), não foi encontrada associação entre este SNP e a maior susceptibilidade para a depressão. Num estudo efectuado recentemente numa coorte da população Tailandesa, Wang *et al.* (2011), descrevem que o alelo A é mais frequente em doentes com depressão. As diferenças genéticas entre os diferentes grupos étnicos podem justificar as discrepâncias descritas.

O SNP rs6295 está localizado na região promotora do gene HTR1A. Como já referido na parte introdutória deste trabalho, é sugerido que a presença do alelo G altera o local de reconhecimento para a NURD, aumentando a expressão deste receptor o que poderá estar na origem de uma menor disponibilidade de serotonina na fenda sináptica, reportada em indivíduos com depressão. Apesar dos resultados obtidos não terem significado estatístico, o aumento da frequência do alelo G na população LES com depressão vs população de doentes sem depressão (0.50 vs 0.42, $p=0.349$), vai de encontro ao descrito por Lemond *et al.* (2003), num estudo realizado no Canada.

O polimorfismo rs4680 do gene COMT, tem sido um dos SNPs mais investigado no âmbito das alterações neuropsiquiátricas. A presença do alelo A está associada a um aumento da actividade enzimática, aumentando assim o catabolismo das catecolaminas como a dopamina, epinefrina e noradrenalina. Este polimorfismo tem sido associado a perturbações do comportamento (Craddock, Owen *et al.* 2006). No presente trabalho, e tal como reportado por outros grupos de investigação, não foi encontrada associação entre este polimorfismo e uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento da depressão.

Tal como referido anteriormente, tratando-se de uma doença complexa, que pode sofrer influência de uma série de factores ambientais, qualquer resultado positivo é relevante no entanto, o resultado negativo não é determinante. O facto da maioria dos estudos apresentar uma população amostral reduzida, reduzindo assim o poder estatístico das relações, condiciona a identificação de genes que, não sendo determinantes para a condição, poderão ter um efeito moderado. Por outro lado, a ausência de métodos padronizados e de uso universal para o diagnóstico de depressão, e muito concretamente para a identificação desta nos doentes LES, poderá explicar em parte, a variabilidade dos resultados encontrados, reduzindo a possibilidade de comparação entre artigos publicados e limitando, em certa medida, o desenho dos estudos.

Na análise destes polimorfismos, em doentes Neurolupus e não Neurolupus, não se observaram resultados estatisticamente significativos. Embora os resultados obtidos sugiram que os polimorfismos estudados não têm influência no desenvolvimento da depressão em doentes com LES e no atingimento do LES no SNC, é necessário o alargamento da população amostral para que estes dados possam ser confirmados.

O alelo e4 da apoE tem sido implicado em diferentes patologias que afectam o sistema nervoso central, nomeadamente doença de Alzheimer, doença de Parkinson, depressão na 3ª idade e transtorno bipolar. Baseada nas diferentes funções que a apolipoproteína E desempenha ao nível do SNC, nomeadamente através dos seus efeitos neurotróficos, antioxidantes e imunomoduladores (Beffert, Danik *et al.* 1998), neste estudo foram também estudadas as respectivas variantes alélicas.

Os resultados obtidos não revelam qualquer diferença estatisticamente significativa das variantes alélicas da ApoE, nem em doentes com depressão nem em doentes com Neurolupus. O presente estudo não replicou os resultados obtidos por Pullmann *et al.* (2004) onde foi sugerida a influência do alelo E4 no desenvolvimento de Neurolupus numa coorte de doentes Eslovacos.

Curiosamente, e tal como no estudo de Pullmann, o único doente LES com o genótipo E4/E4 foi diagnosticado com Neurolupus.

5.2 Estará o gene HTR2A implicado na susceptibilidade para o desenvolvimento do LES?

Ao confrontar os resultados entre a população total de doentes com LES (n=355) e a população controlo composta por indivíduos saudáveis (n=187), verificou-se um aumento significativo da frequência do alelo A na coorte de doentes (0.50 vs 0.41, $p=0.012$, OR=1.38). Este é o primeiro estudo a reportar esta associação. Esta observação levanta algumas questões: Será que existe algum paralelismo entre os mecanismos da depressão e os mecanismos associados ao desenvolvimento do Lúpus? Algumas pistas podem ser apontadas.

Nos órgãos periféricos a serotonina é sintetizada e libertada pelos mastócitos, basófilos, plaquetas e células enterocromafins. O aumento extracelular dos níveis desta amina durante a inflamação e activação plaquetária tem sido documentado (Matsuda *et al.*, 1997).

O processo de inflamação envolve a migração de várias tipos de células sanguíneas, nomeadamente monócitos, para o tecido 'danificado'. Entre as células que fazem parte da imunidade inata, os monócitos, assim como os macrófagos, desempenham uma acção directa na eliminação do microorganismo invasor. A ligação de citocinas, aminas biogénicas e produtos microbianos aos receptores, estimula os monócitos a produzirem citocinas e outras moléculas efectoras de forma a regular a resposta imune inata e adaptativa. Sabe-se que os monócitos activados secretam citocinas como IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF- α (Townley *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2002; Marone *et al.*, 2003; Rampe *et al.*, 2004). Estas moléculas contribuem para as alterações patofisiológicas associadas a uma série de doenças inflamatórias crónicas, como o Lúpus Eritematoso Sistémico.

Estudos recentes têm evidenciado a importância da serotonina como amina imunomoduladora. Por exemplo, tem sido reportada a sua influência numa variedade de respostas celulares como migração, fagocitose, geração do anião superóxido e produção de citocinas (Idzko, Panther *et al.* 2004; Cloez, Bertron *et al.* 2003). A maioria das funções mediadas pela serotonina é regulada pela expressão de diferentes classes de receptores G-protein-coupled e receptores serotoninérgicos, como 5-HTR2A (Idzko, Panther *et al.* 2004; Hoyer, Clarke *et al.* 1994).

Com efeito, e segundo Cloez *et al.* (2003), a expressão do receptor 2A da serotonina em células mononucleares do sangue periférico (PBMC-*Peripheral blood mononuclear cell*) parece regular a libertação de TNF- α e IL-1 β .

CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS

VI. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS

A definição de genes candidatos para o estudo da depressão tem sido baseada no conhecimento de moléculas envolvidas no tratamento farmacológico e nas vias de sinalização monoaminérgica. Vários estudos têm procurado associar os polimorfismos dos genes do sistema serotoninérgico com doenças psiquiátricas, mas os resultados até agora, são inconsistentes. Embora por vezes limitados pelo tamanho reduzido da população amostral, os estudos de associação continuam a ser apropriados para a pesquisa de genes de susceptibilidade com menores efeitos nestas doenças.

Perante os dados descritos na literatura relativos à prevalência da depressão no lúpus e assumindo a dificuldade no seu tratamento, a identificação de polimorfismos no sistema monoaminérgico pode permitir uma melhor compreensão da etiologia da depressão, revelando-se uma ferramenta importante para investigações futuras. Embora haja ainda um longo caminho a percorrer, o principal objectivo destas abordagens é contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas, enquadradas na denominada ‘terapia personalizada’. A resposta aos fármacos parece muitas vezes ser influenciada por variações genéticas. Esta resposta é o resultado da interacção de múltiplas variações ao nível de genes com influências ambientais e depende da estrutura ou expressão funcional de produtos génicos (receptores, transportadores, enzimas), os quais são alvos directos de fármacos. Assim, o esclarecimento dos factores genéticos determinantes da depressão pode contribuir para o desenvolvimento da medicina “preditiva”, proporcionando melhores cuidados de saúde.

No caso concreto do estudo apresentado, apesar de não terem sido observados resultados estatisticamente significativos capazes de sustentar uma associação entre os polimorfismos estudados e a susceptibilidade para a depressão, algumas observações vão no mesmo sentido de outros estudos já realizados. Assim, surge a necessidade não só de aumentar o número de amostras em estudo como também criar um padrão mais ou menos padronizado que permita uma melhor caracterização das populações (Williams *et al.*, 1996; Golimbet *et al.*, 2002; Correa *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2007).

Mais relevante do que conhecer os índices de prevalência o desafio será avaliar a ‘qualidade’ da depressão, de forma a perceber mais claramente os mecanismos que lhe estão associados. Visto que a depressão resulta de uma interacção bastante complexa entre factores genéticos e um conjunto bastante extenso de várias condicionantes ambientais que vão surgindo ao longo da vida, compreender as interacções gene-ambiente e gene-gene, é cada vez mais um desafio. Neste sentido, a avaliação da actividade do LES, da qualidade de vida do doente, dos eventos de *stress* vividos, poderão ser aspectos a ter em conta nos próximos estudos de depressão em doentes com LES.

Ainda que o trabalho apresentado não tenha uma aplicabilidade directa no seio das ciências forenses, são também estudos como este que possibilitam uma melhor compreensão do envolvimento do sistema monoaminérgico em doenças do foro psíquico, nomeadamente a depressão e o comportamento suicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Nasser, A. M., R. M. Ghaleb, *et al.* (2008). "Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus." *Clin Rheumatol* 27(11): 1377-1385.
- ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature, 1999
- Adrien, J. (2002) "Neurobiological bases for the relation between sleep and depression." *Sleep Med. Rev.* 6:341–351.
- Ainiala, H., J. Loukkola, *et al.* (2001). "The prevalence of neuropsychiatric syndromes in systemic lupus erythematosus." *Neurology* 57(3): 496-500.
- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision*. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Anderson, R. J., K. E. Freedland, *et al.* (2001). "The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis." *Diabetes Care* 24(6): 1069-1078.
- Anolik, J. H. (2007). "B cell biology and dysfunction in SLE." *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65(3): 182-186.
- Anttila, S., K. Huuhka, *et al.* (2007) "Interaction between 5-HT1A and BDNF genotypes increases the risk of treatment-resistant depression." *J. Neural Transm.* 114: 1065–1068.
- Ballok, D. A. (2007). "Neuroimmunopathology in a murine model of neuropsychiatric lupus." *Brain Res Rev* 54(1): 67-79.
- Barnes, D. E., G. S. Alexopoulos, *et al.* (2006). "Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study." *Arch Gen Psychiatry* 63(3): 273-279.
- Beffert, U., M. Danik, *et al.* (1998). "The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease" *Brain Res Brain Res Rev.* 27(2):119-42.
- Behl, C., F. Lezoualc'h, *et al.* (1997). "Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro." *Endocrinology* 138(1): 101-106.
- Bjelland, I., A. Dahl, *et al.* (2002). "The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale; An updated review." *Journal of Psychiatric Research* 52:69 – 77.
- Bertram, L., M. B. McQueen, *et al.* (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." *Nat Genet* 39(1): 17-23.
- Bondi, B., A. Buettner *et al.* (2006). "Genetics of suicide." *Molecular Psychiatry* 11:336-351.
- Bonnier, B., P. Gorwood, *et al.* (2002). "Association of 5-HT(2A) receptor gene polymorphism with major affective disorders: the case of a subgroup of bipolar disorder with low suicide risk." *Biol Psychiatry* 51(9): 762-765.
- Brey, R. L. (2007). "Neuropsychiatric lupus: clinical and imaging aspects." *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65(3): 194-199.
- Brey, R. L., S. L. Holliday, *et al.* (2002). "Neuropsychiatric syndromes in lupus: prevalence using standardized definitions." *Neurology* 58(8): 1214-1220.
- Burger, D. and Dayer, J.M. (2002). "Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes." *Ann. NY Acad. Sci.* 966:464.

- Caspi, A., K. Sugden, *et al.* (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." *Science* 301:386–389.
- Cavanagh, J. T., A. J. Carson, *et al.* (2003). "Psychological autopsy studies of suicide: a systematic review." *Psychol Med* 33(3): 395-405.
- Chapman, D. P., G. S. Perry, *et al.* (2005). "The vital link between chronic disease and depressive disorders." *Prev Chronic Dis* 2(1): A14.
- Christiansen, L., Q. Tan, *et al.* (2007). "Candidate gene polymorphisms in the serotonergic pathway: influence on depression symptomatology in an elderly population." *Biol Psychiatry* 61(2): 223-230.
- Clifford, C.P. and D. J. Nunez. (1996). "5HT 2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia" *Lancet* 347, 1830.
- Cloez-Tayarani, I., A. F. Petit-Bertron, *et al.* (2003) "Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine2A receptors." *Int. Immunol.* 15:233.
- Conti, F., C. Alessandri, *et al.* (2004). "Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations: a role for anti-endothelial-cell antibodies." *Arthritis Res Ther* 6(4): R366-372.
- Cools, R., A. C. Roberts, *et al.* (2008). " Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes." *Trends Cogn. Sci.* 12:31–40.
- Craddock, N., M. J. Owen, *et al.* (2006). "The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons." *Mol Psychiatry* 11(5): 446-458.
- Czeh, B. and P. J. Lucassen (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257(5): 250-260.
- de Kloet, E. R., M. Joels, *et al.* (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." *Nat Rev Neurosci* 6(6): 463-475.
- Demyttenaere, K., A. Bonnewyn, *et al.* (2006). "Comorbid painful physical symptoms and depression: prevalence, work loss, and help seeking." *J Affect Disord* 92(2-3): 185-193.
- Digney, A., D. Keriakous, *et al.* (2005). "Differential changes in apolipoprotein E in schizophrenia and bipolar I disorder." *Biol Psychiatry* 57(7): 711-715.
- Domschke, K., C. Hohoff, *et al.* (2008). "Monoamine oxidase A variant influences antidepressant treatment response in female patients with Major Depression." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(1): 224-228.
- Du, L., D. Bakish, *et al.* (2001). "Tryptophan hydroxylase gene 218A/C polymorphism is associated with somatic anxiety in major depressive disorder." *J Affect Disord* 65(1): 37-44.
- Du, L., G. Faludi, *et al.* (2002). "High activity-related allele of MAO-A gene associated with depressed suicide in males." *Neuroreport* 13(9): 1195-1198.
- Edwards, C. J., H. Syddall, *et al.* (2006). "Infections in infancy and the presence of antinuclear antibodies in adult life." *Lupus* 15(4): 213-217.
- Esplagues, J. V. (2002). "NO as a signalling molecule in the nervous system." *Br J Pharmacol* 135:1079-95.
- Freemer, M. M., T. E. King, Jr., *et al.* (2006). "Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus." *Ann Rheum Dis* 65(5): 581-584.

- Frisch, A., D. Postilnick, *et al.* (1999). "Association of unipolar major depressive disorder with genes of the serotonergic and dopaminergic pathways." *Mol Psychiatry* 4(4): 389-392.~
- Gatt, J. M., L. Williams, *et al.* (2010). "Impact of the HTR3A gene with early life trauma on emotional brain networks and depressed mood." *Depression and anxiety* 27: 752-759.
- Gelder M, Mayou R, Geddes J. *Psychiatry: An Oxford core text*. 3rd ed. Oxford; 2005.
- Gizatullin, R., G. Zaboli, *et al.* (2006). "Haplotype analysis reveals tryptophan hydroxylase (TPH) 1 gene variants associated with major depression." *Biol Psychiatry* 59(4): 295-300.
- Graham, R.R., Hom, G. *et al.* (2009). "Review of recent genome-wide association scans in lupus." *J Intern Med* 265: 680–688.
- Hamet, P. and J. Tremblay (2005). "Genetics and genomics of depression." *Metabolism* 54(5 Suppl 1): 10-15.
- Hanly, J. G. (2005). "Neuropsychiatric lupus." *Rheum Dis Clin North Am* 31(2): 273-298.
- Harman, J. S., M. J. Edlund, *et al.* (2005). "The influence of comorbid chronic medical conditions on the adequacy of depression care for older Americans." *J Am Geriatr Soc* 53(12): 2178-2183.
- Heils, A., A. Teufell, *et al.* (1996) "Allelic variation of human Serotonin Transporter gene expression." *Journal of Neurochemistry* 66:2621-2624.
- Herz, J. and U. Beffert (2000). "Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 1(1): 51-58.
- Holmes, D. S. (2001). *Psicologia dos transtornos mentais*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Hoyer, D., D.E. Clarke, *et al.* (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin)." *Pharmacol Rev* 46:157.
- Huang, Y. Y., M. A. Oquendo, *et al.* (2003). "Substance abuse disorder and major depression are associated with the human 5-HT1B receptor gene (HTR1B) G861C polymorphism." *Neuropsychopharmacology* 2003; 28:163–169.
- Huang, X., P. C. Chen, *et al.* (2004). "APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease." *Neurology* 62(12): 2198-2202.
- Hunter, D. J., D. Altshuler, *et al.* (2008). "From Darwin's finches to canaries in the coal mine--mining the genome for new biology." *N Engl J Med* 358(26): 2760-2763.
- Hyman, S. E. (2008). "A glimmer of light for neuropsychiatric disorders." *Nature* 455(7215): 890-893.
- Idzko, M., E. Panther, *et al.* (2004). "The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release." *J. Immunol* 172:6011.
- Illi, A., E. Setälä-Soikkeli, *et al.* (2009). "5-HTR1A, 5-HTR2A, 5-HTR6, TPH1 and TPH2 polymorphisms and major depression." *Neuroreport* 20(12): 1125-1128.
- Irwin, M. R. and A. H. Miller (2007). "Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery." *Brain Behav Immun* 21(4): 374-383.
- Iverson, G. L., M. J. Harnish, *et al.* (1998). "Using single-subject methodology to investigate psychiatric treatments in systemic lupus erythematosus." *Lupus* 7(5): 295-300.
- Iverson, G. L., D. C. Sawyer, *et al.* (2001). "Assessing depression in systemic lupus erythematosus: determining reliable change." *Lupus* 10(4): 266-271.
- James, J. A., K. M. Kaufman, *et al.* (1997). "An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest* 100(12): 3019-3026.

- Jansson, M., M. Gatz, *et al.* (2003). "Association between depressed mood in the elderly and a 5-HT_{2A} gene variant." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B(1): 79-84.
- Jennekens, F. G. and L. Kater (2002). "The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 2. Pathogenetic mechanisms of clinical syndromes: a literature investigation." *Rheumatology (Oxford)* 41(6): 619-630.
- Joca, S.R., and F. S. Guimaraes (2006). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects." *Psychopharmacology* 185:298-305.
- Johnson, A. E., C. Gordon, *et al.* (1995). "The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth." *Arthritis Rheum* 38(4): 551-558.
- Kalia, M. (2005). "Neurobiological basis of depression: an update." *Metabolism* 54(5 Suppl 1): 24-27.
- Kasama, T., T. Odai, *et al.* (2008). "Chemokines in systemic lupus erythematosus involving the central nervous system." *Front Biosci* 13: 2527-2536.
- Katon, W. and P. P. Roy-Byrne (1988). "Antidepressants in the medically ill: diagnosis and treatment in primary care." *Clin Chem* 34(5): 829-836.
- Katon, W. J. (2003). "Clinical and health services relationships between major depression, depressive symptoms, and general medical illness" *Biological Psychiatry* 54(3): 216-226.
- Katon, W., E. H., Lin, *et al.* (2007). "The association of depression and anxiety with medical symptom burden in patients with chronic medical illness." *Gen Hosp Psychiatry* 29(2), 147-155.
- Kim, H. S. and H. S. Kim (2008). "Risk factors for suicide attempts among Korean adolescents." *Child Psychiatry Hum Dev* 39(3): 221-235.
- Kishi, T., T. Kitajima, *et al.* (2009). "Genetic association analysis of serotonin 2A receptor gene (HTR_{2A}) with bipolar disorder and major depressive disorder in the Japanese population." *Neurosci Res* 64(2): 231-234.
- Kiss, J.P. (2008). "Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression." *Neurochem Int* 52:34-9.
- Kozora, E., M. Ellison, *et al.* (2005). "Major life stress, coping styles, and social support in relation to psychological distress in patients with systemic lupus erythematosus." *Lupus* 14:363-372.
- Kozora, E., M. C. Ellison, *et al.* (2006). "Depression, fatigue, and pain in systemic lupus erythematosus (SLE): relationship to the American College of Rheumatology SLE neuropsychological battery." *Arthritis Rheum* 55(4): 628-635.
- Kowal, C., L.A. Degiorgio, *et al.* (2007). "Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52):19854-19859.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." *Nature* 455(7215): 894-902.
- Lahita, R. G. (2000). "Sex hormones and systemic lupus erythematosus." *Rheum Dis Clin North Am* 26(4): 951-968.
- Lanfume, L., Hamon, M. (2004). "5-HT₁ receptors." *Curr. Drug TargetsCNS Neurol. Disord.* 3:1-10.
- Landolt, P. H. and Wehrle R. (2009). "Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood?" *European Journal of Neuroscience* 29: 1795-1809.
- Lapteva, L., M. Nowak, *et al.* (2006). "Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 54(8): 2505-2514.

- Leal, B., A. Bettencourt, *et al.* (2011). "The serotonin HTR2A receptor 102 T>C gene polymorphism is associated with depression in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus" *Lupus* 20(4).
- Lemond, S., G. Turecki, *et al.* (2003). "Impaired Repression at a 5-Hydroxytryptamine 1A Receptor Gene Polymorphism Associated with Major Depression and Suicide" *Journal of Neuroscience* 23(25):8788–8799.
- Lopez de Lara, C., J. Brezo, *et al.* (2007). "Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression." *Biol Psychiatry* 62(1): 72-80.
- Lotta, T., J. Vidgren, *et al.* (1995). "Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme." *Biochemistry* 34(13): 4202-4210.
- Lucca, G., C. M. Comim, *et al.* (2009). "Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain." *Neurochem Int* 54(5-6): 358-362.
- Mahley, R. W. and Y. Huang (1999). "Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond." *Curr Opin Lipidol* 10(3): 207-217.
- Majka, D. S. and V. M. Holers (2006). "Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 65(5): 561-563.
- Mann, J. J., D. A., Brent, *et al.* (2001). "The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system." *Neuropsychopharmacology* 24:467-477.
- Mann, J. J. (2005). "The medical management of depression." *N Engl J Med* 353(17): 1819-1834.
- Marone, G., F. Granata, *et al.* (2003). "The histamine-cytokine network in allergic inflammation." *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:S83.
- Massat, I., D. Souery, *et al.* (2005). "Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study." *Mol Psychiatry* 10(6): 598-605.
- Matsuda, H., H. Ushio, *et al.* H. (1997). "Human platelets can initiate T cell-dependent contact sensitivity through local serotonin release mediated by IgE antibodies." *J. Immunol.* 158:2891.
- Matsumoto, K., K. Yobimoto, *et al.* (1999). "Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice." *Brain Res* 839(1): 74-84.
- McLaughlin, K. J., J. L. Gomez, *et al.* (2007). "The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms." *Brain Res* 1161: 56-64.
- McLeod, T. M., A. L. Lopez-Figueroa, *et al.* (2001). "Nitric oxide, stress, and depression." *Psychopharmacol Bull* 35(1): 24-41.
- Mekli, K., A. Payton, *et al.* (2011). "The HTR1A and HTR1B receptor genes influence stress-related information processing." *European Neuropsychopharmacology* 21:129–139.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, *et al.* (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.
- Mok, C. C. and C. S. Lau (2003). "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *J Clin Pathol* 56(7): 481-490.
- Moreno, D. H., R. S. Moreno, R. A. Moreno. Transtornos do humor. In: Neto, M. R. L. e H. Elkis. *Psiquiatria básica*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

- Moussavi, S., S. Chatterji, *et al.* (2007). "Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys". *Lancet* 370(9590): 851-858.
- Mudd, P. A., B. N. Teague, *et al.* (2006). "Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus." *Scand J Immunol* 64(3): 211-218.
- Mullis, K.B., S. Faloona, *et al.* (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symp Qunt Biol* 51: 263-273.
- Mungas, D. (1991). "In-office mental status testing: a practical guide." *Geriatrics* 46(7): 54-58, 63, 66.
- Myers, R. L., D. C. Airey, *et al.* (2007). "Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (HTR_{2A}) influence gene expression." *Biol Psychiatry* 61(2): 167-173.
- Myint, A. M., B. E. Leonard, *et al.* (2005). "Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression." *J Affect Disord* 88(2): 167-173.
- Nakai, M., T. Kawamata, *et al.* (1996). "Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia." *Neurosci Lett* 211(1): 41-44.
- Nakamura, K., Y. Sugawara, *et al.* (2006). "Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels." *J Neurosci* 26(2): 530-534.
- Nardi, A. E. (2006). *Questões atuais sobre depressão*. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo:Lemos, 2006.
- Nery, F. G., E. F. Borba, *et al.* (2007). "Major depressive disorder and disease activity in systemic lupus erythematosus." *Compr Psychiatry* 48(1): 14-19.
- Ng, F., M. Berk, *et al.* (2008). "Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications." *Int J Neuropsychopharmacol* 11(6): 851-876.
- Nielsen, D. A., G. L. Jenkins, *et al.* (1997). "Sequence, splice site and population frequency distribution analyses of the polymorphic human tryptophan hydroxylase intron 7." *Brain Res Mol Brain Res* 45(1): 145-148.
- Niesler, B., T. Flohr, *et al.* (2001). T, "Association between the 50 UTR variant C178T of the serotonin receptor gene HTR_{3A} and bipolar affective disorder". *Pharmacogenetics* 11: 471-475.
- Parsons, M. J., U. M. D'Souza, *et al.* (2004). "The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity." *Biol Psychiatry* 56(6): 406-410.
- Peng, C. H., S. H. Chiou, *et al.* (2008). "Neuroprotection by Imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway." *Eur Neuropsychopharmacol* 18(2): 128-140.
- Peters, E. J., S. L. Slager, *et al.* (2004). "Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response." *Mol Psychiatry* 9(9): 879-889.
- Picardi A, Abeni D. Stressful life events and skin diseases: disentangling evidence from myth. *Psychosom* 2001;70: 118-36
- Pitas, R. E., J. K. Boyles, *et al.* (1987). "Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins." *Biochim Biophys Acta* 917(1): 148-161.
- Prince, M. J., R. H. Harwood, *et al.* (1998). "A prospective population-based cohort study of the effects of disablement and social milieu on the onset and maintenance of late-life depression. The Gospel Oak Project VII." *Psychol Med* 28(2): 337-350.
- Pullmann R., M. Škereňová, *et al.* (2004) "Apolipoprotein E polymorphism in patients with neuropsychiatric SLE." *Clinical Rheumatology* 23 (2):97-101.

- Purandare, K. N., A. C. Wagle, *et al.* (1999). "Psychiatric morbidity in patients with systemic lupus erythematosus." *Qjm* 92(5): 283-286.
- Raber, J. (2008). "AR, apoE, and cognitive function." *Horm Behav* 53(5): 706-715.
- Rahman, A. and D. A. Isenberg (2008). "Systemic lupus erythematosus." *N Engl J Med* 358(9): 929-939.
- Raison, C. L., L. Capuron, *et al.* (2006). "Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression." *Trends Immunol* 27(1): 24-31.
- Rampe, D., L. Wang, *et al.* (2004). "P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia." *J. Neuroimmunol.* 147:56.
- Risch, N., R. Herrell, *et al.* "Interactions between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis." *JAMA* 301:2462–2471.
- Ronnelid, J., A. Tejde, *et al.* (2003). "Immune complexes from SLE sera induce IL10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an FcγRII dependent mechanism: implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE." *Ann Rheum Dis* 62(1): 37-42.
- aan het Rot, M., J. Jansay, *et al.* (2009). "Neurobiological mechanisms in major depressive disorder." *Canadian Medical Association Journal* 180(3): 305-313.
- Sabol, S. Z., S. Hu, *et al.* (1998). "A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter." *Hum Genet* 103(3): 273-279.
- Schulze, T. G., D. J. Muller, *et al.* (2000). "Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder." *Am J Med Genet* 96(6): 801-803.
- Serretti, A., R. Calati, *et al.* (2006) "Serotonin Transporter gene variants and behavior: a comprehensive review." *Current Drug Targets* 7:1659-1669.
- Serreti, A. A. Drago, *et al.* (2007). "HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies." *Curr. Med. Chem* 14:2053-2069.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, *et al.* (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* 22(8): 3251-3261.
- Smith, A. K., I. Dimulescu, *et al.* (2008) "Genetic evaluation of the serotonergic system in chronic fatigue syndrome." *Psychoneuroendocrinology* 33:188–197.
- Stacey, G., L. Ziaugra, *et al.* (2009). "SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform." *Current Protocols in Human Genetics* 2.12.1-2.12.18.
- Stahl SM. *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- Stojanovich, L., G. Zandman-Goddard, *et al.* (2007). "Psychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus." *Autoimmun Rev* 6(6): 421-426.
- Stoll, T., Y. Kauer, *et al.* (2001). "Prediction of depression in systemic lupus erythematosus patients using SF-36 mental health scores." *Rheumatology* 40:695-8.
- Strobel A, L. Gutknecht, *et al.* (2003). "Allelic variation in 5-HT1A receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits." *J Neural Transm* 110:1445–53.
- Sullivan, K. E. (2000). "Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications." *Rheum Dis Clin North Am* 26(2): 229-256, v-vi.

- Sweet, J. N. A. Doninger, *et al.* (2004) "Factors influencing cognitive function, sleep and quality of life in individuals with systemic lupus erythematosus: A review of the literature." *Clin Neuropsychol* 18(1):132-147.
- Tan, E. M., A. S. Cohen, *et al.* (1982). "The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 25(11): 1271-1277.
- Tapanes, F. J., M. Vasquez, *et al.* (2000). "Cluster analysis of antinuclear autoantibodies in the prognosis of SLE nephropathy: are anti-extractable nuclear antibodies protective?" *Lupus* 9(6): 437-444.
- Tomita, M., R. L. Khan, *et al.* (2004). "The potential pathogenetic link between peripheral immune activation and the central innate immune response in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus." *Med Hypotheses* 62(3): 325-335.
- Townley, R. G. and Horiba, M. (2003). "Airway hyperresponsiveness: a story of mice and men and cytokines." *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 24:85.
- Tremeau, F., L. Staner, *et al.* (2005). "Suicide attempts and family history of suicide in three psychiatric populations." *Suicide Life Threat Behav* 35(6): 702-713.
- Tsai, C. Y., T. H. Wu, *et al.* (1994). "Cerebrospinal fluid interleukin-6, prostaglandin E2 and autoantibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and central nervous system infections." *Scand J Rheumatol* 23(2): 57-63.
- Tuglu, C., S. H. Kara, *et al.* (2003). "Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder." *Psychopharmacology (Berl)* 170(4): 429-433.
- Uher, R., and P. McGuffin. (2008). "The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: Review and methodological analysis." *Molecular Psychiatry* 13:131-146.
- Urani, A., S. Chourbaji, *et al.* (2005). "Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines." *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 805-828.
- Ursin, R. (2002). "Serotonin and sleep" *Sleep Med. Rev* 6:55-69.
- Valencia, X., C. Yarboro, *et al.* (2007). "Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus." *J Immunol* 178(4): 2579-2588.
- Viana, M. M., L. A. De Marco, *et al.* (2006). "Investigation of A218C tryptophan hydroxylase polymorphism: association with familial suicide behavior and proband's suicide attempt characteristics." *Genes Brain Behav* 5(4): 340-345.
- Wang, H., T. Lieh, *et al.* (2011). "TPH1 is associated with major depressive disorder but not with SSRI/SNRI response in Taiwanese patients" *Psychopharmacology* 213:773-779
- Wray, N. R., M. R. James, *et al.* (2009) "Accurate, large-scale genotyping of 5HTTLPR and flanking single nucleotide polymorphisms in an association study of depression, anxiety, and personality measures." *Biol. Psychiatry* 66:468-476
- Weisgraber, K. H., T. L. Innerarity, *et al.* (1982). "Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site." *J Biol Chem* 257(5): 2518-2521.
- Wells, K. B., J. M. Golding, *et al.* (1988). "Psychiatric disorder in a sample of the general population with and without chronic medical conditions." *Am J Psychiatry* 145(8): 976-981.
- Yen, Y. C., G. W. Rebok, *et al.* (2007). "ApoE4 allele is associated with late-life depression: a population-based study." *Am J Geriatr Psychiatry* 15(10): 858-868.

- Yu, S., F. Holsboer, *et al.* (2008). "Neuronal actions of glucocorticoids: focus on depression." *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3-5): 300-309.
- Yu, Y. W., S. J. Tsai, *et al.* (2005). "Association study of a monoamine oxidase a gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response." *Neuropsychopharmacology* 30(9): 1719-1723.
- Zandman-Goddard, G., E. Peeva, *et al.* (2007). "Gender and autoimmunity." *Autoimmun Rev* 6(6): 366-372.
- Zhang, K., Q. Xu, *et al.* (2009). "The combined effects of the 5-HTTLPR and 5-HTT1A genes modulates the relationship between negative life events and major depressive disorder in a Chinese population." *J. Affect. Disord* 114:224–231.
- Zigmond, A. P. & Snaith, R. P. (1983). "The Hospital Anxiety and Depression Scale." *Acta Psychiatrica Scandinavica* 67:361 – 370.
- Zill, P., A. Büttner, *et al.* (2004a). "Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims." *Biol Psychiatry* 56:581–6.
- Zill, P., T. C., Baghai, *et al.* (2004b). "SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression." *Mol Psychiatry* 9:1030–6.
- Zill, P., A. Buttner, *et al.* (2007). "Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study." *J Psychiatr Res* 41(1-2): 168-173.
- Zill, P., A. Buttner, *et al.* (2009). "Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain." *Neuroscience* 159(4): 1274-1282.
- Zorrilla, E. P., L. Luborsky, *et al.* (2001). "The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review." *Brain Behav Immun* 15(3): 199-226.